

NCU-G1s rolle i energimetabolismen i skjelettmuskel

- Mulig modulator av PPAR og potensiell betydning for metabolsk syndrom

Masteroppgave for graden Master i farmasi



Hanne Haugum

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultetet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2012

NCU-G1s rolle i energimetabolismen i skjelettmuskel

- Mulig modulator av PPAR og potensiell betydning for metabolsk syndrom

Hanne Haugum

Masteroppgave for graden Master i farmasi



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultetet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2012

Veiledere

Professor G. Hege Thoresen

Professor Arild C. Rustan

Professor Winnie Eskild

Stipendiat Xiang Y. Kong

© Hanne Haugum

2012

NCU-G1s rolle i energimetabolismen i skjelettmuskel

Hanne Haugum

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, i samarbeid med Institutt for molekylær biovitenskap, Universitetet i Oslo i perioden august 2011 til mai 2012. Deler av masteroppgaven ble presentert i en poster på Farmakologisk vintermøte på Beitostølen 26. – 29. januar 2012.

Jeg vil gjerne rette en stor takk til mine veiledere, professor G. Hege Thoresen, professor Arild C. Rustan, professor Winnie Eskild og stipendiat Xiang Y. Kong, for meget god oppfølging, rådgivning og støtte gjennom hele masteroppgaven. En stor takk rettes til Xiang Y. Kong for meget god oppfølging og veiledning på laboratoriene og ikke minst god støtte og motivasjon underveis. Stor takk til G. Hege Thoresen for god hjelp og veiledning gjennom hele masteroppgaven og under selve skriveprosessen. Jeg vil også rette en stor takk til Arild C. Rustan, for faglige innspill og hjelp til å besvare store og små spørsmål, og Winnie Eskild, for faglige innspill og kunnskap.

Jeg vil også takke Eili T. Kase for hjelp med RNA-isolering, Nataša Nikolić for humant cDNA og Siril S. Bakke og Yuan Z. Feng for hjelp med høsting til Western. Takk for at dere alltid stilte opp og besvarte store og små spørsmål. Takk til Caroline Nguyen for godt samarbeid med medielaging og coating av celleflasker på cellelaben. Jeg vil dessuten takke de flotte ingeniørene i 4. etasje for hjelp til store og små problemer på laboratoriene og for deres smittende gode humør. Takk til medlemmene i «Muskelbunten» for lærerike og interessante tirsdagsmøter. En stor takk rettes til hele 4.etasje for at dere har skapt et hyggelig arbeidsmiljø.

Jeg vil gjerne takke kull 2012 for fem arbeidsomme, men morsomme og uforglemmelige år sammen. En ekstra stor takk rettes til «Farmasijentene» for godt vennskap, latter og gode minner. Takk til jentene på hovedfagskontoret for gode faglige samtaler, støtte og en hyggelig tid sammen.

Takk til min kjære familie for all støtte og motivasjon under hele studiet. En ekstra stor takk til storebror Svein Arild, for at du alltid har stilt opp for meg.

Blindern, mai 2012

Hanne Haugum

Innholdsfortegnelse

Summary in English	XI
Sammendrag.....	XIII
Forkortelser	XV
1 Innledning	1
1.1 Metabolsk syndrom.....	1
1.1.1 Fedme	1
1.1.2 Insulinresistens.....	2
1.1.3 Type 2-diabetes	2
1.2 Skjelettmuskel.....	3
1.2.1 Muskelfibertyper	3
1.3 Metabolisme i skjelettmuskel	4
1.3.1 Fettsyremetabolisme i skjelettmuskel	4
1.3.2 Glukosemetabolisme i skjelettmuskel	9
1.3.3 Metabolsk fleksibilitet	11
1.4 Peroxisom proliferator-aktiverede reseptorer	12
1.4.1 PPAR α	15
1.4.2 PPAR β	15
1.4.3 PPAR γ	16
1.4.4 PPAR og modulering av fettsyremetabolismen.....	17
1.5 NCU-G1.....	18
1.5.1 Mulige funksjoner til NCU-G1	19
1.5.2 Opprettelse av NCU-G1-knockout-mus	21
1.6 Substanser benyttet i denne oppgaven.....	23
1.6.1 Energisubstanser	23
1.6.2 GW 7647.....	23
1.6.3 GW 501516.....	23
1.6.4 Karbonylcyanid-p-trifluorometoksyfenylhydrazon	23
1.7 Formålet med denne masteroppgaven	25
2 Materialer og metoder	26
2.1 Materialer.....	26
2.2 Opprettelse av cellebank.....	27

2.2.1	Isolering av satellittceller fra mus	27
2.2.2	Opprensing av satellittceller	28
2.2.3	Oppskalering og splitting.....	30
2.2.4	Telling av celler	30
2.2.5	Frysing og tining av satellittceller.....	30
2.3	Dyrking av celler til forsøk	31
2.3.1	Coating av forsøksbrett og -flasker med 2 % Matrigel	31
2.3.2	Utsåing av satellittceller	32
2.3.3	Vekst av satellittceller og differensiering til myotuber	32
2.4	Substratoksidasjonsmetoden.....	32
2.4.1	Radioaktive isotoper.....	35
2.4.2	Utsåing og behandling av myotuber.....	35
2.4.3	Trapping.....	36
2.4.4	Måling av substratoksidasjon.....	36
2.4.5	Høsting til måling av celleassosierte substrater og protein	36
2.4.6	Måling av celleassosiert substrat (CA).....	36
2.4.7	Måling av proteinmengde	37
2.5	Real-time RT-PCR	37
2.5.1	Høsting av celler og isolering av total RNA.....	41
2.5.2	Kvantifisering av RNA.....	42
2.5.3	Syntese av cDNA	42
2.5.4	Verifisering av primerkvalitet.....	43
2.5.5	Kvantifisering ved hjelp av real-time RT-PCR	45
2.6	Westernblotting	46
2.6.1	Høsting av celler	50
2.6.2	Måling av proteinmengde	50
2.6.3	SDS-PAGE	51
2.6.4	Westernblotting	51
2.6.5	Deteksjon av målproteiner.....	51
2.6.6	Visualisering og kvantifisering	52
2.6.7	Stripping av PVDF-membran	52
2.7	Statistiske analyser	53
3	Resultater	54

3.1	Donorkarakteristika	54
3.2	Oksidasjon og akkumulering av oljesyre.....	56
3.2.1	Donorspesifikk oksidasjon og akkumulering av oljesyre.....	56
3.2.2	Oksidasjon og akkumulering av oljesyre.....	59
3.2.3	Effekt av FCCP på oksidasjon av oljesyre	61
3.3	Oksidasjon og akkumulering av glukose	63
3.3.1	Basal oksidasjon og akkumulering av glukose	63
3.3.2	Effekt av FCCP på oksidasjon av glukose.....	65
3.4	Substratpreferanse og suppressibilitet	67
3.4.1	Substratpreferanse	67
3.4.2	Suppressibilitet av glukose på oljesyreoksidasjon	69
3.4.3	Suppressibilitet av oljesyre på glukoseoksidasjon	70
3.5	Effekt av agonister på oksidasjon og akkumulering av oljesyre.....	72
3.5.1	Effekt av PPAR α -agonist på oksidasjon og akkumulering av oljesyre.....	72
3.5.2	Effekt av PPAR β -agonist på oksidasjon og akkumulering av oljesyre.....	74
3.6	Genekspresjon.....	77
3.6.1	Basal genekspresjon	77
3.6.2	Effekt av PPAR α -agonist på genekspresjon.....	78
3.6.3	Effekt av PPAR β -agonist på genekspresjon.....	79
3.7	Proteinuttrykk av Angptl4	81
3.8	Ekspresjon av NCU-G1 i humane myotuber	83
4	Diskusjon.....	84
4.1	Bekreftelse av validiteten til forsøksdesignet	84
4.2	Effekt av NCU-G1 på energimetabolismen i skjelettmuskel.....	85
4.3	Effekt av NCU-G1 på effekt av PPAR-agonister	89
4.4	Uttrykk av NCU-G1 i humane myotuber	92
5	Konklusjon.....	93
	Litteraturliste.....	95
	Appendiks	103

Summary in English

Introduction: Skeletal muscle is an important tissue involved in oxidation of lipids and glucose, and could affect the metabolic budget for the whole organism. Skeletal muscle also plays an important role in the development of obesity and insulin resistance, which are important factors of the metabolic syndrome. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) play important roles in the regulation of energy metabolism in skeletal muscle. PPARs are ligand-dependent nuclear receptors, which require both ligands and co-regulators to regulate transcriptional activity of target genes. Kidney predominant protein, NCU-G1, is a protein with unknown function. It has been shown that NCU-G1 stimulates PPAR α -controlled gene expression, and NCU-G1 is therefore a potential co-activator for PPAR α . To explore NCU-G1's potential functions, an NCU-G1-knockout-mouse model was established, and preliminary studies on these animals indicated an altered muscle fiber type composition. Based on these data, the object of this thesis was to study the function of NCU-G1 in skeletal muscle, by comparing myotubes from NCU-G1-knockout- and wild type-mice.

Methods: Skeletal muscle biopsies were taken from NCU-G1-knockout- and wild type-mice. Cultures of satellite cells were established, and the satellite cells were proliferated and differentiated into multinuclear myotubes. The myotubes were pre-treated with either PPAR α -agonist (GW 7647) or PPAR β -agonist (GW 501516). Fatty acid- and glucose-metabolism were examined by substrate oxidation assays by incubating the myotubes for 4 hours with either [1- 14 C]oleic acid or [14 C(U)]glucose. The mRNA-expression of a selection of genes involved in energy metabolism in skeletal muscle was examined by real-time RT-PCR. Protein expression was examined by Western blotting.

Results: Preliminary results indicate reduced oleic acid oxidation and increased glucose oxidation in knockout-myotubes compared to wild type-myotubes. Pre-treatment with a PPAR α -agonist stimulated oleic acid oxidation in both knockout- and wild type-myotubes, with no differences between the two donor groups. Pre-treatment with a PPAR β -agonist also stimulated oleic acid oxidation in both knockout- and wild type-myotubes, but with a higher response in the knockout-myotubes. At the mRNA-level there was observed a higher expression of Angptl4 in the knockout-myotubes, while all the other selected genes were down regulated. Pre-treatment with either a PPAR α - or PPAR β -agonist increased the expression of several PPAR-regulated genes in both donor groups, but the increase was

somewhat smaller in the knockout-myotubes. The protein expression of Angptl4 did not show any difference between the two donor groups.

Discussion and conclusion: The results presented in this thesis showed a tendency of an altered energy metabolism in myotubes from NCU-G1-knockout-mice. This may indicate that NCU-G1 has a role in regulating energy metabolism in skeletal muscle. The results indicate that NCU-G1 probably can function as a co-regulator for PPAR, but it shows a certain degree of selectivity toward which genes and functions that are affected. Further studies are needed to elucidate the role of NCU-G1 in energy metabolism in skeletal muscle.

Sammendrag

Innledning: Skjelettmuskel er et viktig vev involvert i oksidasjon av lipider og glukose, og vil kunne påvirke energihomeostasen for hele organismen. Skjelettmuskel spiller også en viktig rolle i utvikling av fedme og insulinresistens, som er viktige faktorer i metabolsk syndrom. Peroxisom proliferator-aktiverte reseptorer (PPAR) spiller viktige roller i reguleringen av energimetabolismen i skjelettmuskel. PPAR er ligandavhengige kjernereseptorer som krever både ligander og koregulatorer for å regulere transkripsjon av målgener. Nyrepredominant protein, NCU-G1, er et protein med ukjent funksjon. Det har blitt vist at NCU-G1 stimulerer PPAR α -kontrollert genekspressjon, og NCU-G1 er derfor en mulig koaktivator for PPAR α . For å undersøke NCU-G1s mulige funksjoner, ble en NCU-G1-knockout-musemodell opprettet, og preliminare studier på disse dyrene tydet på at det forelå en endret fibertypesammensetning. Basert på disse resultatene, var formålet med denne oppgaven å studere NCU-G1s rolle i energimetabolismen i skjelettmuskel, ved å sammenligne myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus.

Metode: Skjelettmuskelbiopsier ble tatt fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus. Kulturer av satellittceller ble etablert, og satellittcellene ble prolifert og differensiert til flerkjernede myotuber. Myotubene ble forbehandlet med enten PPAR α -agonist (GW 7647) eller PPAR β -agonist (GW 501516). Fettsyre- og glukosemetabolisme ble undersøkt ved hjelp av substratoksidasjonsforsøk ved å inkubere myotubene i 4 timer med [1- 14 C]oljesyre eller [14 C(U)]glukose. mRNA-uttrykket av et utvalg gener involvert i energimetabolismen i skjelettmuskel ble undersøkt ved hjelp av real-time RT-PCR. Proteinuttrykk ble undersøkt ved hjelp av Westernblotting.

Resultater: Preliminære data tyder på lavere oljesyreoksidasjon og høyere glukoseoksidasjon hos knockout-myotubene sammenlignet med villtype-myotubene. Forbehandling med en PPAR α -agonist stimulerte oljesyreoksidasjon hos både knockout- og villtype-myotuber, uten forskjell mellom donorgruppene. Forbehandling med en PPAR β -agonist stimulerte også oljesyreoksidasjon hos både knockout- og villtype-myotuber, men med en høyere respons hos knockout-myotubene. På mRNA-nivå ble det observert et høyere uttrykk av Angptl4 hos knockout-myotubene, mens samtlige av de andre utvalgte genene var nedregulert. Forbehandling med PPAR α - og PPAR β -agonister økte uttrykket av flere PPAR-regulerte

gener i begge donorgruppene, men økningen var noe mindre i knockout-mytubene. Proteinuttrykket av Angptl4 viste ingen forskjell mellom donorgruppene.

Diskusjon og konklusjon: Resultatene presentert i denne oppgaven viste en tendens til at det forelå en endret energimetabolisme hos myotuber fra NCU-G1-knockout-mus. Dette kan tyde på at NCU-G1 har en rolle i reguleringen av energimetabolismen i skjelettmuskel. Resultatene indikerer at NCU-G1 trolig kan fungere som en koregulator for PPAR, men at den utviser en viss grad av selektivitet mot hvilke gener og funksjoner som påvirkes. Videre studier er nødvendig for å utforske NCU-G1s rolle i energimetabolismen i skjelettmuskel.

Forkortelser

ACBP	Acyl-CoA-bindende protein
ACC	Acetyl-CoA-karboksylase
ACL	ATP-citrate-lyase
ACS	Acyl-CoA-syntase
ADP	Adenosindifosfat
AF	Aktiveringsfunksjon
Akt	Proteinkinase B
Angptl	Angiopoietin-lignende protein
ATGL	Fettvev triglyseridlipase
ATP	Adenosintrifosfat
BCA	«Bicinchoninic acid»
BSA	Bovint serumalbumin
CA	Celleassosiert substrat
CAT	Karnitintranslokase
cDNA	Komplementært DNA
Ci	Curie
CO ₂	Karbondioksid
CoA	Coenzym A
cpm	Antall lysglimt per minutt
CPT	Karnitin palmitoyltransferase
CRBP	cellulært retinol-bindende protein
CT	Terskelverdi
DAG	Diacylglycerol
dH ₂ O	Destillert vann
DMEM	«Dulbecco's Modified Eagle Medium»
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dNTP	Deoksyribonukleosidtrifosfater
DPBS	«Dulbecco's Phosphate Buffered Salin»
ECL	Forsterket kjemiluminescens
EDL	<i>Musculus extensor digitorum longus</i>
EDTA	Etyldiamintetraeddiksyre
EO	Ekstremt overvektig
ES	Embryonal stamcelle
FABP	Fettsyrebindende protein
FAD ⁺	Flavin-adenin-dinukleotid
FADH ₂	Redusert flavin-adenin-dinukleotid
FAS	Fettsyresyntase
FAT/CD36	Fettsyretranslokase/«Cluster of Differentiation 36»
FBS	Føtalt storfeserum
FCCP	Karbonylcyanid-p-trifluorometoksyfenylhydrazon
FFA	Fri fettsyre
FP	«Foot print»
G-3-p	Glyserol-3-fosfat
GLUT	Glukosetransportør
GS	Glykogensyntase
H ⁺	Hydrogenion (proton)

H ₂ O	Vann
HAT	Histon acetyltransferase
HBSS	«Hanks Balance Salt Solution»
HDAC	Histon deacetylase
HK	Heksokinase
HMT	Histon metyltransferase
HPR	Pepperotperoksidase
HPRT	«Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase»
HSL	Hormonsensitiv lipase
IL	Interleukin
IMTG	Intramuskulære triglyserider
IRS	Insulinreseptorsubstrat
kDa	Kilodalton
KMI	Kroppsmasseindeks
KO	Knockout
L	Leucin
LBD	Ligandbindende-domene
LCE	Langkjedet-acyl-elongase
LD	Normalvektig («Lean donor»)
LPL	Lipoprotein lipase
LXR	Lever-X-reseptor
M	Molar (mol/liter)
MGL	Monoglyserid lipase
MHC	«Myosin Heavy Chain»
mRNA	Messenger ribonukleinsyrer
MUFA	Enumettet fettsyre
MQ	MilliQ
NAD ⁺	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADH	Redusert nikotinamid-adenin-dinukleotid
NES	Kjerneeksportsignal
NGT	Normal glukosetoleranse
NLS	Kjernelokaliseringssignal
NR	Kjernereseptor
NRQ	Normalisert relativ andel
NTC	Negativ templat kontroll
O ₂	Oksygen
OA	Oljesyre
PAGE	Polyakrylamid-gelelektroforese
PAI	Plasminogen-aktivator inhibitor
PCR	Polymerase-kjedereaksjon
PKC ζ/λ	Atypisk proteinkinase C ζ/λ
PDH	Pyruvat dehydrogenase
PDK-1	Fosfor-3-fosfoinositidavhengig kinase-1
PDK 4	Pyruvat dehydrogenase kinase 4
PGC1 α	PPAR γ -koaktivator-1 α
PI3K	Fosfatidylinositol 3-kinase
PIP2	Fosfatidylinositol (4,5)-disfosfat
PIP3	Fosfatidylinositol (3,4,5)-trisfosfat
PLIN 2	Perilipin 2
PPAR	Peroksisom proliferator-aktivert reseptor

PPRE	Peroksisom proliferator-responselement
PVDF	Polyvinylidifluorid
RA	Retinsyre
RNA	Ribonukleinsyre
rpm	Omdreiningar per minutt
RT	Revers transkriptase
RXR	Retinoid-X-reseptor
SCD	Stearoyl-CoA desaturase
SDS	Natriumdodekylsulfat
SEM	Standardfeil til gjennomsnittet
SH	Scr homologi
SOL	<i>Musculus soleus</i>
ssDNA	Enkelttrådet DNA
T2D	Type 2-diabetes
TAE	Tris-acetat-etyl-diamintetraeddiksyre
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-bufret saltløsning
TBST	Tween tris-bufret saltløsning
TG	Triglyserid
TIP47	Hale-interagerende protein på 47 kDa
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
TZD	Thiazolidinedioner
UCP	Avkoblingsprotein
VLDL	«Very low density lipoprotein»
VT	Villtype
WAT	Hvitt fettvev
WHO	Verdens helseorganisasjon
X	Vilkårlig aminosyre

1 Innledning

1.1 Metabolsk syndrom

Metabolsk syndrom er en samling av metabolske risikofaktorer som predisponerer for kardiovaskulær sykdom og type 2-diabetes [1, 2]. Abdominal fedme, aterogen dyslipidemi, hypertensjon, insulinresistens både med og uten glukoseintoleranse, en proinflammatorisk tilstand og en protrombotisk tilstand, utgjør de metabolske risikofaktorene, og hver av disse består av flere komponenter [1]. Metabolsk syndrom utvikles gradvis over tid, og ved utvikling av type 2-diabetes vil risikoen for kardiovaskulær sykdom øke ytterligere [1, 2]. Det har blitt foreslått to mulige hovedårsaker til utvikling av metabolsk syndrom, deriblant fedme, særlig abdominal fedme, og insulinresistens, som er tett forbundet [1, 2]. Den økende forekomsten av metabolsk syndrom tilskrives ofte den økende forekomsten av fedme [1-3]. Det finnes ingen optimal behandling av metabolsk syndrom, og per i dag behandles hver risikofaktor separat. Livsstilsendringer er en viktig del av behandlingen, hvorav fysisk aktivitet, vektreduksjon og kosthold vil bedre samtlige av de metabolske risikofaktorene, men er ikke gjennomførbart for alle som er rammet av tilstanden [2].

1.1.1 Fedme

Hos voksne er fedme klassifisert av verdens helseorganisasjon (WHO) til å være en kroppsmasseindeks (KMI) over 30. KMI beregnes som kroppsvekt i kilogram per kvadratet av høyden i meter (kg/m^2) [4]. Fedme skyldes primært en positiv energibalanse over tid, hvor energiinntaket overskrider energiforbruket [5]. Det har blitt foreslått at en redusert fetttsyreoksidasjon, i forhold til glukoseoksidasjon, kan være en mulig bidragsfaktor til vektøkning [6]. En endret fetttsyremetabolisme i fettvevet fører til frisetelse av store mengder frie fettssyrer (FFA), fra lipolyse av triglyserider (TG), som fører til at muskel, lever og pankreas overbelastes med lipider. Disse prosessene resulterer i en ektopisk lipidakkumulering som bidrar til forverring av insulinresistens, aterogen dyslipidemi og hyperinsulinemi, som sammen bidrar til utvikling av metabolsk syndrom [2, 6]. I tillegg frisettes flere adipokiner, som plasminogen-aktivator inhibitor-1 (PAI-1), tumornekrosefaktor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) og resistin, fra fettvevet, som bidrar til den proinflammatoriske og den protrombotiske tilstanden sett i det metabolske syndromet [2].

1.1.2 Insulinresistens

Opptak av glukose i skjelettmuskel og fettvev etter et måltid er viktig for å opprettholde en normal plasmakonsentrasjon av glukose. Skjelettmuskel er særlig viktig i denne sammenhengen ved at den står for opptil 75 % av alt insulin-mediert glukoseopptak [7, 8]. Insulinresistens oppstår når det er en redusert respons til normale sirkulerende nivåer av insulin og en reduksjon i det insulin-medierte glukoseopptaket [9]. Årsakene til insulinresistens er ikke fullstendig klarlagt, men det har blitt funnet en sterk kobling mellom insulinresistens og lipidakkumulering i andre vev enn fettvev, som lever og skjelettmuskel [10]. En ubalanse mellom opptak og oksidasjon av fettsyrer er foreslått til å være ansvarlig for denne lipidakkumuleringen, og dermed en mulig årsak til insulinresistens ved fedme og type 2-diabetes [9]. Akkumulering av FFA og lipidmetabolitter, som langkjedet acyl-CoA, diacylglycerol (DAG) og TG, kan føre til endringer i insulinsignaleringsveien (avsnitt 1.3.2), via aktivering av kinaser som nedregulerer insulinets virkning [11]. Teoretisk kan det tenkes at en reduksjon i fettsyreoksidasjonen fører til en akkumulering av lipidintermediater, mens en økning i fettsyreoksidasjon kan redusere potensialet for insulinresistens. Derimot er situasjonen mer kompleks enn dette, da det foreligger et dynamisk samspill fettsyrer og glukose i skjelettmuskel (avsnitt 1.3.3) [9].

1.1.3 Type 2-diabetes

Type 2-diabetes er en kronisk sykdom karakterisert av kronisk hyperglykemi med forstyrrelser i karbohydrat-, fett- og proteinomsetningen, som følge av varierende grader av insulinresistens og relativ insulinmangel [12]. Patogenesen til type 2-diabetes er karakterisert av en forutgående fase med insulinresistens som krever en kompensatorisk økning i insulinsekresjonen fra β -cellene i pankreas for å opprettholde en normal plasmakonsentrasjon av glukose. Type 2-diabetes utvikles når denne insulinresistensen er assosiert med en unormal β -cellefunksjon, som da resulterer i en tilstand med relativ insulinmangel som fører til hyperglykemi [13]. Hyperglykemi over tid fører til utvikling av en rekke komplikasjoner som nefropati, retinopati, nevropati og kardiovaskulær sykdom, og bidrar til en økt morbiditet og mortalitet [7].

1.2 Skjelettmuskel

Skjelettmuskel er det største vevet i menneskekroppen, og utgjør 40-50 % av den totale kroppsmassen [14]. Skjelettmuskel består av muskelceller, nervefibre, blodårer og bindevev som binder de enkelte muskelfibre sammen i muskelbunter, og dette utgjør da selve muskelen. Muskelceller, også kalt muskelfibre, dannes under fosterlivet ved fusjon av myoblaster til en flerkjernet myotube, som senere differensieres til modne muskelfibre [14, 15]. Nydannelsen av muskelfibre etter fødselen er derimot svært begrenset [15]. Satellittceller er en gruppe myogene forløperceller som ved skade eller vekst av muskelen, kan aktiveres og differensiere til myoblaster, som deretter kan fusjonere med eksisterende muskelfibre for å reparere skadet muskel eller øke muskelfibrenes størrelse. En liten del av satellittcellene vil ikke undergå differensiering, men i stede proliferere slik at nivået av satellittceller opprettholdes [16]. Inne i muskelfibre ligger sarkomeren som er den funksjonelle enheten i skjelettmuskelen. Sarkomeren består av myosin- og aktin-filamenter, som i respons til nervesignaler, vil mediere kontraksjon av muskelen i en adenosintrifosfat (ATP)-avhengig prosess [14, 15].

1.2.1 Muskelfibertyper

Skjelettmuskel inneholder en blanding av flere typer muskelfibre, som kan klassifiseres som type I- (oksidative/langsomme) eller type II- (glykolytiske/raske) fibre [14, 17]. Type I-fibre er langsomme, utholdende og oksidative fibre, siden de inneholder et høyt antall mitokondrier og benytter oksidativ fosforylering til sin ATP-produksjon, som gir en stabil og langvarig tilførsel av ATP [17]. I og med at oksidativ fosforylering er avhengig av oksygen (avsnitt 1.3.1), medfører dette at type I-fibrenes ATP-produksjon er begrenset av sirkulasjonssystemets kapasitet for oksygentransport [15]. Type II-fibre kan deles inn i tre grupper, hvorav type IIb har det laveste nivået av mitokondrier og oksidative enzymer, og benytter glykolyse til sin ATP-produksjon. Disse fibre er ikke avhengig av oksygen til sin ATP-produksjon og vil ikke begrenses av oksygentilførselen, men i fravær av oksygen vil melkesyre dannes. Dette medfører at disse fibre ikke er like utholdende, siden melkesyren vil senke surhetsgraden i cytosol og redusere myosinhodenes ATPase-aktivitet [15, 17]. Type IIa og IIx er intermediære, deres egenskaper ligger et sted mellom type I- og type IIb-fibre med hensyn på oksidative egenskaper og kontraksjonshastighet [14, 17].

Skjelettmuskel hos voksne mennesker har stor evne til fornybarhet (plastisitet), som innebærer at den er i stand til å øke sin størrelse og sitt proteinuttrykk i respons til bruk, og i tillegg i noen grad endre sin fibertypesammensetning [14, 16, 17]. Det har blant annet blitt vist at det foreligger et lavere nivå av type I-fibre hos personer med fedme, og et enda lavere nivå har blitt vist hos personer med både fedme og type 2 diabetes [18, 19].

1.3 Metabolisme i skjelettmuskel

Siden skjelettmuskel hos mennesker utgjør opptil 50 % av den totale kroppsmassen, vil energimetabolismen i skjelettmuskel kunne påvirke energibalansen for hele organismen [14, 20]. Skjelettmuskel benytter både FFA og glukose som kilder til sin energiproduksjon. Under faste er plasmakonsentrasjonen av glukose og insulin lav, og dette medfører en redusert insulin-mediert inhibering av lipolysen i fettvevet og et redusert insulin-mediert opptak av glukose i skjelettmuskel. Dette resulterer i en økt plasmakonsentrasjon av FFA, som da vil fungere som hovedkilden til energiproduksjonen. Etter inntak av glukose vil glukose være den primære energikilden, siden en medfølgende økning i insulinkonsentrasjonen vil inhibere lipolysen og øke opptaket av glukose i skjelettmuskel [11].

1.3.1 Fettsyremetabolisme i skjelettmuskel

Opptak

Opptaket av FFA inn i muskelcellene skjer både via passiv diffusjon og aktiv transport ved hjelp av transportproteiner i cellemembranen. Flere slike fettsyretransportører har blitt funnet i skjelettmuskel, deriblant fettsyretranslokase/«Cluster of Differentiation 36» (FAT/CD36), plasmamembran-bundet fettsyrebindende protein (FABPpm) og de vevsspesifikke fettsyretransportørproteinene (FATP) 1 og 4 [21, 22]. Av disse er det FAT/CD36 som har blitt antatt til å være den viktigste transportøren av FFA [9]. Maksimalt opptak av FFA via slike transportører er avhengig av antallet transportører som finnes på cellemembranen, da disse prosessene kan mettes [23]. Både muskelkontraksjon og insulin er vist til å indusere translokasjon av FAT/CD36 fra intracellulære lagre til membranen, og medføre et økt fettsyreopptak [24, 25].

Transport

Inne i cellen vil FFA transporteres av fettsyrebindende proteiner (FABP), før de omdannes til acyl-CoA av acyl-CoA-syntaser (ACS) [22, 26]. Acyl-CoA blir deretter fraktet ved hjelp av acyl-CoA-bindende protein (ACBP), hvorav mesteparten transporteres til mitokondriene eller peroksisomene for β -oksidasjon, mens en liten andel transporteres til endoplasmatisk retikulum for omdannelse til intracellulære lipidmediater, som TG, fosfolipider, DAG og ceramid [9, 26]. I tillegg kan acyl-CoA og enkelte FFA bindes til transkripsjonsfaktorer, som peroksisom proliferator-aktiverte reseptorer (PPAR), og regulere genekspresjon (avsnitt 1.4) [26].

Opptak i mitokondriene

Før β -oksidasjon kan skje må langkjedet acyl-CoA transporteres over den indre og den ytre mitokondriemembranen [22, 27]. I den ytre mitokondriemembranen sitter enzymet karnitin palmitoyltransferase-1 (CPT-1), som katalyserer reaksjonen mellom langkjedet acyl-CoA og karnitin slik at det blir dannet acylkarnitin som kan transporteres over membranen ved hjelp av karnitintranslokase (CAT). Inne i mitokondriene omdannes acylkarnitin tilbake til langkjedet acyl-CoA av karnitin palmitoyltransferase-2 (CPT-2) [9]. Aktiviteten til CPT-1 er viktig for regulering av fettsyreoksidasjonen, og har blitt foreslått til å bli regulert av to mekanismer. En av disse er malonyl-CoA, som er et av mellomproduktene i lipogenesen, som ved en høy konsentrasjon vil hemme opptaket av acyl-CoA via inhibering av CPT-1 og føre til at fettsyreoksidasjonen reduseres og lipogenesen økes [6, 9, 28]. Det har også blitt foreslått at konsentrasjonen av karnitin kan redusere opptaket via CPT-1, ved at karnitin binder til seg acetyl-grupper fra acetyl-CoA og på denne måten reduseres konsentrasjonen av karnitin og mindre blir da tilgjengelig til å inngå som substrat for CPT-1 [28].

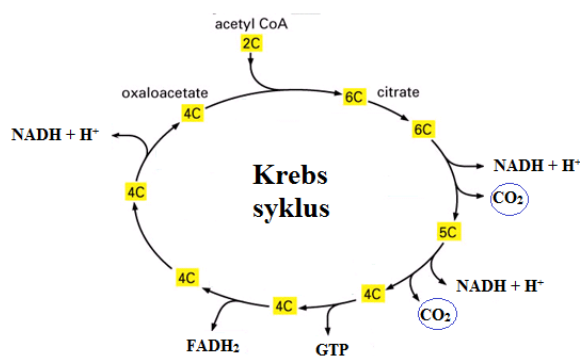
β -oksidasjon

Inne i mitokondriene undergår acyl-CoA β -oksidasjon, som er en syklus bestående av fire reaksjonstrinn med flere enzymer med ulik kjedelengdespesifisitet [27]. For hver syklus forkortes acyl-CoA med to karbonatomer og det blir dannet acetyl-CoA og høyenergielektroner i form av redusert flavin-adenin-dinukleotid (FADH_2) og redusert nikotin-adenin-dinukleotid (NADH) [9, 27].

Krebs syklus og oksidativ fosforylering

Acetyl-CoA kan deretter gå inn i Krebs syklus, også kalt sitronsyresyklusen (figur 1.1), hvor acetyl-gruppen i acetyl-CoA overføres til oksaloacetat, som deretter oksideres til sitronsyre. For hver syklus omdannes to karbonatomer fra acetyl-CoA til to molekyler karbondioksid (CO_2), i tillegg til at det dannes guanositrifosfat (GTP) og høyenergielektroner i form av NADH og FADH_2 . Krebs syklus krever tilstedeværelse av oksygen for å kunne overføre høyenergielektroner fra NADH til oksygen, slik at NAD^+ gjenannes og syklusen kan opprettholdes [29].

Ved oksidativ fosforylering vil NADH og FADH_2 , både fra β -oksidasjon og Krebs syklus, overføre disse høyenergielektronene til elektrontransportkjeden, hvor elektronene overføres mellom elektronbærere i denne kjeden. Dette fører til dannelse av en protongradient som driver dannelsen av ATP, ved å aktivere enzymet ATP-syntase som fosforylerer adenosindifosfat (ADP) til ATP [9, 29]. GTP fra Krebs syklus overfører en fosfatgruppe til ADP som fører til dannelsen av ATP. Elektrontransportkjeden forbruker oksygen, ved at elektronene etter å ha avgitt sin energi overføres til oksygen, som sammen med protoner (H^+) danner vann (figur 1.2) [29].



Figur 1.1: Krebs syklus. For hver syklus omdannes to karbonatomer fra acetyl-CoA til to molekyler karbondioksid (CO_2), tre molekyler redusert nikotin-adenin-dinukleotid (NADH), ett molekyl guanositrifosfat (GTP) og ett molekyl redusert flavin-adenin-dinukleotid (FADH_2). Modifisert fra [29].

Lipolyse

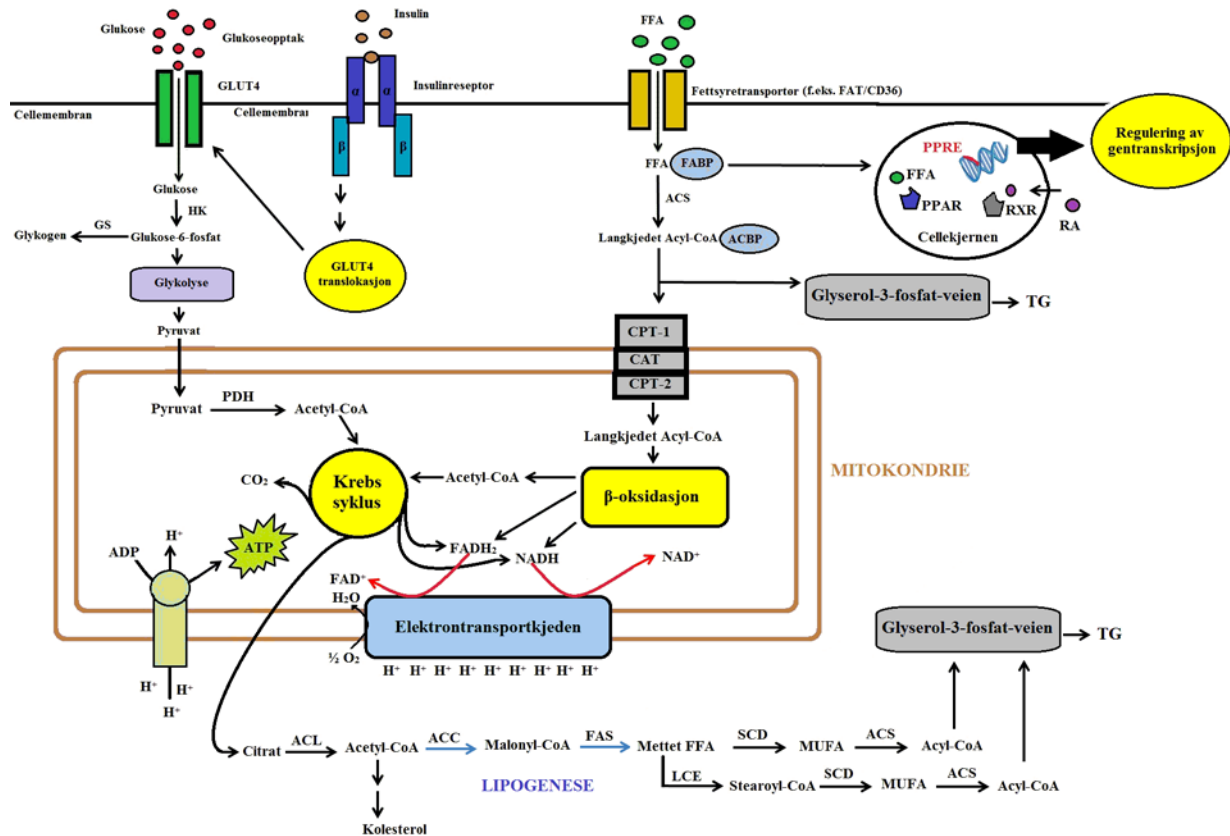
Skjelettmuskel får tilført FFA fra flere kilder, blant annet FFA bundet til albumin fra lipolyse i fettvevet, ved hjelp av hormonsensitiv lipase (HSL), eller fra hydrolyse av sirkulerende cylomikroner og «very low density lipoprotein» (VLDL) i blodet, ved hjelp av lipoprotein lipase (LPL). Inne i selve muskelen kan intramuskulære TG (IMTG) spaltes og fungere som kilder til FFA [9, 28]. Fettvev triglyseridlipase (ATGL), monoglyserid lipase (MGL) og HSL har blitt foreslått til å være involvert i lipolyse av IMTG [28]. Angiopoietin-lignende protein 4 (Angptl4) er et protein som sekreses fra både muskel og hvitt fettvev (WAT), og har blitt vist til å kunne hemme aktiviteten til LPL, som da vil føre til en redusert lipolyse av TG i blod og

dermed et redusert opptak av FFA i muskel [30, 31]. I tillegg har Angptl4 også blitt vist til å stimulere lipolyse i WAT, som fører til en økt plasmakonsentrasjon av glyserol og FFA og en reduksjon av WAT [31]. Det har blitt foreslått at Angptl4 kan være involvert i å oppregulere uttrykket av HSL i muskelceller, som antas å føre til en økt lipolyse og dannelse av acyl-CoA i muskelcellene [31].

Lagring

Ved energioverskudd kan acyl-CoA lagres i skjelettmuskel som IMTG. Dette skjer via glyserol-3-fosfat-veien, hvor acyl-CoA acetyleres med glyserol-3-fosfat og undergår en rekke enzymatiske trinn for omdannelse til TG [32]. Tilsvarende kan citrat fra Krebs syklus inngå i dannelsen av TG, ved at citrat omdannes til acetyl-CoA av enzymet ATP-citrat-lyase (ACL). Acetyl-CoA kan deretter omdannes via lipogenesen til palmitoyl-CoA og stearoyl-CoA (figur 1.2) [6]. Palmitoyl-CoA og stearoyl-CoA er begge mettede fettsyrer, som sammen med mettede fettsyrer fra kosten, kan omdannes til enumettede fettsyrer (MUFA) av enzymet stearoyl-CoA desaturase (SCD) [6, 33, 34]. MUFA kan deretter omdannes av ACS til acyl-CoA-substrater som kan gå inn i glyserol-3-fosfatveien for dannelse av TG [32, 33]. Hos mennesker finnes det to isoformer av dette enzymet, SCD1 og SCD2, og et lavt nivå av begge isoformene er funnet i human skjelettmuskel, som kan tyde på at skjelettmuskel er avhengig av opptak av MUFA [34].

Lagring av fett intramuskulært skjer vanligvis i såkalte lipiddråper, som hovedsakelig består av TG og kolesterolistere som er omgitt av et monolag av fosfolipider og assosierte lipiddråpeproteiner [35]. Noen av de mest undersøkte lipiddråpeproteinene er perilipin, perilipin 2 (PLIN 2) og hale-interagerende protein på 47 kDa (TIP47) [36]. PLIN 2 har blitt foreslått til å være er det dominerende lipiddråpeassosierte proteinet i human skjelettmuskel [37]. Phillips et al. har foreslått at PLIN 2 kan bidra til økt forestring av FFA som TG i lipiddråper eller beskytte lipiddråpene mot lipolyse, og på denne måten beskytte mot de skadelige effektene av fettsyreoksidasjon på insulinsensitiviteten og glukosetoleransen [37].



Figur 1.2: Metabolisme av FFA og glukose i skjelettmuskel. Skjelettmuskel benytter både frie fettsyrer (FFA) og glukose til sin energiproduksjon, hvorav begge undergår en rekke prosesser for omdannelse til energi i form av adenosintrifosfat (ATP). ACBP; acyl-CoA-bindende protein, ACC; acetyl-CoA-karboxylase, ACL; ATP-citrat-lyase, ACS; acyl-CoA-syntaser, ADP; adenosindifosfat, CAT; karnitintranslokase, CO₂; karbondioksid, CPT-1; karnitin palmitoyltransferase-1, CPT-2; karnitin palmitoyltransferase-2, FABP; fettsyrebindende protein, FADH₂; redusert flavin-adenin-dinukleotid, FAD⁺; flavin-adenin-dinukleotid, FAS; fettsyresyntase, FAT/CD36; fettsyretranslokase/«Cluster of Differentiation 36», GS; glykogensyntase, H₂O; vann, H⁺; proton, HK; heksokinase, LCE; langkjedet-acyl-elongase, MUFA; enumettet fettsyre, NADH; redusert nikotinamid-adenin-dinukleotid, NAD⁺; nikotinamid-adenin-dinukleotid, O₂; oksygen, PDH; pyruvat dehydrogenase, PPAR; peroksisom proliferator-aktivert reseptor, PPARE; peroksisom proliferator-responselement, RXR; retinoid-X-reseptor, RA; retinsyre, SCD; stearoyl-CoA desaturase, TG; triglyserid. Modifisert fra [6, 7, 9-11, 26, 29, 32].

1.3.2 Glukosemetabolisme i skjelettmuskel

Insulin

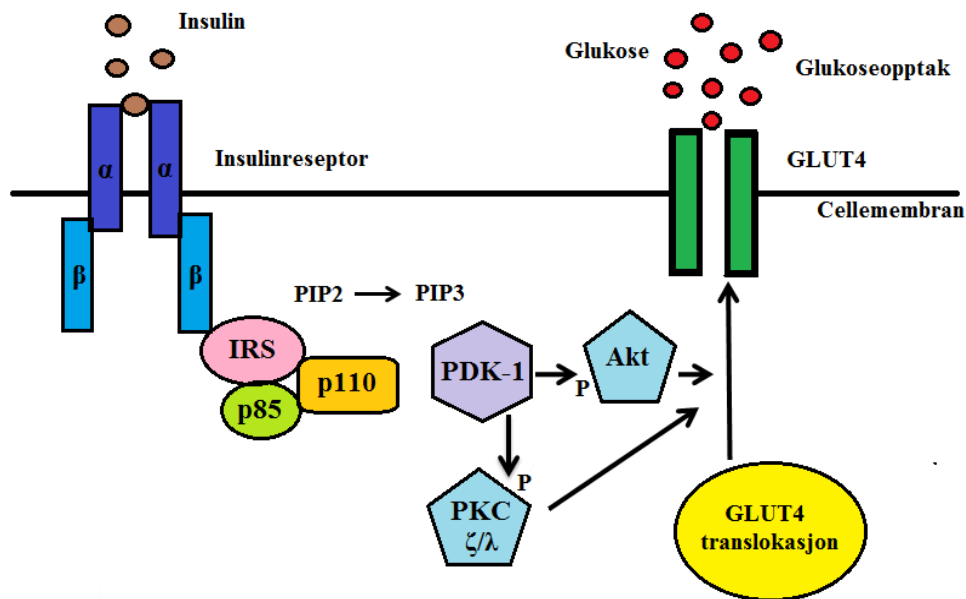
Insulin er et hormon som er essensielt i reguleringen av plasmakonsentrasjonen av glukose, og sekreseres fra de insulinproduserende β -cellene i pankreas i respons til en stigende plasmakonsentrasjon av glukose. Insulin senker glukosekonsentrasjonen i plasma ved å øke opptaket av glukose i muskel og fettvev, og ved å stimulere dannelsen og lagring av TG og glykogen i disse vevene. I tillegg hemmer insulin glukoseproduksjonen og glukosefrisettelsen i leveren, og hemmer lipolyse av TG. Skjelettmuskel er viktig i denne sammenhengen ved at den står for opptil 75 % av alt insulin-mediert glukoseopptak [7, 8].

Opptak av glukose

Insulin øker glukoseopptaket i muskel og fettvev ved å stimulere translokasjonen av glukosetransportør 4 (GLUT4) fra intracellulære lagringssteder til cellemembranen (figur 1.3) [7, 8]. GLUT4 tilhører en familie av glukosetransportører med i alt 13 medlemmer, hvorav GLUT1-4 er best karakterisert. GLUT1 finnes i de fleste vev og er ansvarlig for basalopptaket av glukose, GLUT2 finnes hovedsakelig i β -celler og i lever, GLUT3 er til stede under fosterutvikling og i voksne neuroner, mens GLUT4 finnes hovedsakelig i fett og muskel og er den transportøren som er ansvarlig for det insulin-medierte glukoseopptaket. Det hastighetsbestemmende trinnet i det insulin-medierte glukoseopptaket i muskel og fettvev er translokasjonen av GLUT4 til cellemembranen [38].

Insulin stimulerer translokasjonen av GLUT4 ved å binde til insulinreseptoren, som tilhører en av familie reseptortyrosinkinaser. Insulinreseptoren er et heterotetramerisk membrankompleks som består av to α - og to β -subenheter. Ved binding av insulin til α -subenheten aktiveres den indre kinaseaktiviteten i β -subenheten, hvilket resulterer i autofosforylering og aktivering av reseptoren. Insulinreseptorsubstrater (IRS) kan deretter binde til insulinreseptoren og fosforyleres, og vil da kunne fungere som bindingssteder for signalproteiner med Src homolog 2 (SH2)-domener. Dette fører blant annet til aktivering av Type 1A fosfatidylinositol 3' kinase (PI3K), som er en dimer bestående av p85 og p110. PI3K vil da rekruttere og aktivere andre proteiner, som fosfatidylinositol (3,4,5)-trisfosfat (PIP3), 3-fosfoinositidavhengig kinase-1 (PDK-1) og proteinkinase B (Akt) (figur 1.3). PDK-1 aktiverer Akt og atypisk proteinkinase C ζ/λ (PKC ζ/λ), som resulterer i translokasjon av

GLUT4 til cellemembranen [7, 8]. Data tyder på at aktivering av PI3K-veien ikke er tilstrekkelig for å forklare hele det insulin-medierte glukoseopptaket, og at det trolig også er en annen signalvei involvert. Denne signalveien innebærer at insulinreseptoren ligger i såkalte «lipidflåter» i plasmamembranen og aktivering ved insulinstimulering resulterer i en kaskade som fører til aktivering av et G-protein, TC10, som er involvert i translokasjonen av GLUT4 [38].



Figur 1.3: Insulin-mediert opptak av glukose. Ved binding av insulin til insulinreseptoren utløses en autofosforylering av reseptoren som muliggjør binding av insulinreseptorsubstrater (IRS). IRS vil kunne fungere som bindingssete for signalproteiner, som for eksempel p85. Type 1A fosfatidylinositol 3' kinase (PI3K) er en dimer bestående av p85 og p110, og ved rekruttering av p85 til cellemembranen vil p110 fosforylere fosfatidylinositol (4,5)-bisfosfat (PIP2) til fosfatidylinositol (3,4,5)-trisfosfat (PIP3). Dette fører til rekruttering og aktivering av blant annet fosfor-3-fosfoinositidavhengig kinase-1 (PDK-1), som vil fosforylere (P) atypisk proteinkinase C λ/δ (PKC C λ/δ) og proteinkinase B (Akt), og resultere i translokasjon av glukosetransportør 4 (GLUT4) til cellemembranen. GLUT4 kan da transportere glukose inn i cellen. Modifisert fra [7].

Glykolyse og oksidativ fosforylering

Inne i cellen fosforyleres glukose umiddelbart av heksokinase (HK) til glukose-6-fosfat, som deretter kan undergå glykolyse (figur 1.2) [8, 11, 29]. Glykolyse er en prosess bestående av ti trinn og hvert trinn er katalysert av ulike enzymer, og sluttresultatet er at glukose brytes ned til pyruvat og det blir dannet ATP og NADH. Pyruvat kan deretter diffundere inn i mitokondriene og omdannes til acetyl-CoA, CO₂ og NADH av enzymkomplekset pyruvat

dehydrogenase (PDH) [29]. Nydannet acetyl-CoA kan da gå inn i Krebs syklus på samme måte som acetyl-CoA dannet fra fettsyremetabolismen og inngå i dannelsen av ATP (avsnitt 1.3.1). NADH fra glykolysen kan overføre høy energi elektroner til elektrontransportkjeden og føre til dannelse av ATP (avsnitt 1.3.1) [29]. Inhibering av PDH, ved blant annet pyruvat dehydrogenase kinase (PDK), vil føre til en forskyvning av energimetabolismen, ved at glukosemetabolismen reduseres og fettsyremetabolismen økes [20]. PDH krever tilførsel av oksygen for å omdanne pyruvat til acetyl-CoA, ved at elektronene i NADH må overføres til oksygen, slik at NAD^+ gjendannes og kan inngå i reaksjonen på nytt. Ved fravær av oksygen vil derfor den eneste muligheten for energiproduksjon være glykolysen, hvor pyruvat vil omdannes til melkesyre for å regenerere NAD^+ og opprettholde glykolysen [29].

Lagring og glykogenolyse

Ved energioverskudd vil glukose-6-fosfat omdannes av glykogensyntase (GS) til glykogen og lagres små granula i cytoplasma [8, 11, 29]. Ved behov for energi kan det lagrede glykogenet raskt spaltes til glukose-1-fosfat, som deretter undergår glykolyse [29]. Glukose kan i tillegg, på samme måte som for FFA, etter omdannelse til acetyl-CoA eller citrat, omdannes til IMTG, som ved energibehov kan spaltes til FFA (avsnitt 1.3.1) [6, 32].

1.3.3 Metabolsk fleksibilitet

Det ble tidlig vist at det foreligger et dynamisk samspill mellom fettsyrer og glukose i skjelettmuskel. Allerede i 1963 viste Randle et al. at oksidasjon av fettsyrer hemmet både opptak og oksidasjon av glukose via en mekanismen nå kjent som «Randle»-syklus [39]. Mekanismen for denne prosessen innebærer at acetyl-CoA og citrat fra fettsyreoksidasjonen hemmer PDH og fosfofruktokinase, som da fører til en økt konsentrasjon av glukose-6-fosfat og hemming av heksokinase [39]. I senere tid har «Revers Randle»-syklus blitt foreslått, hvor overskudd av glukose har en hemmende effekt på fettsyreoksidasjonen [40].

Metabolsk fleksibilitet er et begrep som benyttes om evnen til skjelettmuskel til å bytte mellom bruk av glukose og fettsyrer som energikilde, fra oksidasjon av lipider under faste til å øke oksidasjonen av glukose og undertrykke lipidoksidasjonen i respons til insulin etter et måltid [41, 42]. Kelley et al. har definert tapet av denne evnen, til å raskt bytte mellom glukose og lipider som energikilde, som metabolsk infleksibilitet, hvor det foreligger en manglende evne til respondere til faste ved å øke lipidoksidasjonen og en manglende respons

på insulinstimulering til å øke glukoseoksidasjonen [42]. Både fedme, type 2-diabetes og insulinresistens har blitt knyttet til en redusert evne til å oksidere lipider under faste og en redusert evne til å bytte fra lipidoksidasjon til glukoseoksidasjon ved insulinstimulering [43].

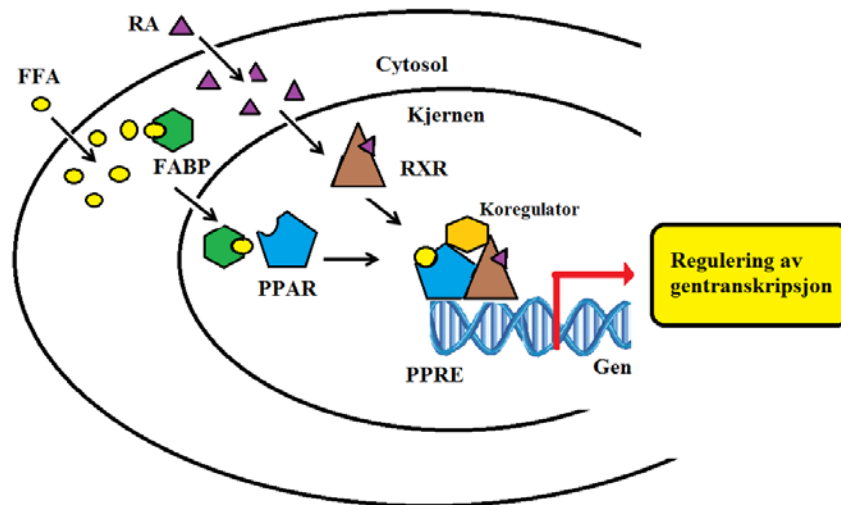
For å beskrive metabolsk fleksibilitet *in vitro* benyttes begrepene suppressibilitet, adaptabilitet og substratregulert fleksibilitet [43, 44]. Suppressibilitet er evnen cellene har til å undertrykke fettsyreoksidasjonen i respons til tilsetning av glukose, og adaptabilitet er evnen til å øke fettsyreoksidasjonen i respons til økt fettsyretilgjengelighet [44]. Ukropcova et al. fant at suppressibiliteten *in vitro* var invers korrelert med insulinsensitiviteten og metabolsk fleksibilitet *in vivo*, mens for adaptabiliteten *in vitro* ble det funnet en positiv korrelasjon til disse parameterne [44]. Substratregulert fleksibilitet er cellenes evne til å øke fettsyreoksidasjonen fra rett etter et måltid (lav fettsyrekonsentrasjon, høy glukosekonsentrasjon) til faste (høy fettsyrekonsentrasjon, lav glukosekonsentrasjon) [43].

1.4 Peroxisom proliferator-aktivererte reseptorer

Peroxisom proliferator-aktivererte reseptorer (PPAR) er ligandavhengige kjernereseptorer som tilhører en superfamilie av nukleære transkripsjonsfaktorer. PPAR-familien består av tre isoformer; PPAR α , PPAR β , også kalt PPAR δ , og PPAR γ [20, 45, 46]. Disse reseptorene finnes hovedsakelig i kjernen og utøver sin effekt ved å regulere transkripsjon av gener som har et peroksisom proliferator-responselement (PPRE) [20]. Slike PPRE ligger vanligvis i promotordelen eller i andre regulatoriske deler av målgenet [20, 45]. Funksjonelle PPRE har blitt funnet i regulatoriske områder i gener som blant annet koder for proteiner involvert i energimetabolismen i skjelettmuskel, deriblant proteiner involvert i opptak (LPL, FAT/CD36, FABP), metabolisme (ACS, CPT-1), mitokondrielle avkoblingsproteiner (UCP) og skiftet mellom glukose- og fettsyreoksidasjon (PDK 4) [20, 47]. Det har blitt vist at PPRE ikke nødvendigvis er selektive for de enkelte isoformene i PPAR-familien [48].

PPAR heterodimeriserer med retinoid-X-reseptoren (RXR) (figur 1.4.) og danner et reseptorkompleks, som ved minst én bundet ligand vil bindes til PPRE [45]. Aktivering av gentranskripsjonen kan skje i nærvær av én PPAR-ligand eller 9-*cis*-retinsyre (RA), som bindes til RXR, men aktivering ved to bundne ligander vil resultere i en økt gentranskripsjon [20]. Ligander til PPAR er langkjedede fettsyrer og derivater fra disse. Siden PPAR hovedsakelig finnes i kjernen, må ligandene transporteres inn i kjernen. Det har blitt vist at

fettsyrebindende proteiner (FABP) kan transportere ligander til spesifikke PPAR. FABP ligger i cytosol og vil ved binding gå inn i kjernen og assosiere med en spesifikk PPAR [20].



Figur 1.4: PPAR-regulert gentranskripsjon. Peroxisom proliferator-aktivert reseptor (PPAR) heterodimeriserer med retinoid-X-reseptoren (RXR) og regulerer transkripsjonen av gener som har et peroksisom proliferator-resonselement (PPRE). Fettsyrebindende proteiner (FABP) kan trolig transportere ligander til PPAR. Modifisert fra [20].

PPAR har 4 funksjonelle domener; A/B, C, D og E/F (figur 1.5). A/B-domenet har en liganduavhengig aktiveringsfunksjon, aktiveringsfunksjon 1 (AF-1), C-domenet har en DNA-bindende region bestående av to sinkfingre med alfa-heliks DNA-bindende motiver, og i mellom ligger en hengselregion, som er viktig for interaksjon med koregulatorer og bevaring av den funksjonelle strukturen til reseptoren [20, 46]. I tillegg har reseptorene et ligandbindende-domene (LBD), som har en ligandavhengig aktiveringsfunksjon, AF-2. LBD er viktig for dimeriseringen med RXR og interaksjon med koaktivatorer [20]. LBD hos PPAR er hydrofobt og større enn hos andre kjernereseptorer, i tillegg til at det har en mer fleksibel inngang. Dette kan trolig forklare evnen til disse reseptorene til å binde et stort spekter av eksogene og endogene lipofile ligander [20].



Figur 1.5: Skjematiske skisse over de funksjonelle domenene i PPAR. A/B-domenet i den N-terminale enden har en liganduavhengig aktiveringsfunksjon (AF-1), C-domenet utgjør den DNA-bindende regionen, D-domenet er viktig for interaksjon med kofaktorer og E/F-domenet har en ligandavhengig aktiveringsfunksjon (AF-2). Modifisert fra [20].

PPAR krever koregulatorer, som modifiserer og endrer kromatinstrukturen, og på denne måten påvirker den transkripsjonelle aktiviteten. Disse koregulatorene kalles koaktivatorer når de aktiverer transkripsjonen og korepressorer når de undertrykker transkripsjonen [46]. Ved binding av agonister, vil hydrogenbindinger mellom AF-2-heliksen og karboksylgrupper på liganden føre til at heliksen foldes mot LBD og dermed stabiliserer binding av liganden og muliggjør binding av koaktivatorproteiner. Denne konformasjonsendringen resulterer i frisetelse av korepressorproteiner som hindrer transkripsjon [20]. Derimot, når liganden som bindes til reseptoren er en antagonist, vil bindingen føre til en konformasjonsendring som fremmer rekruttering av korepressorer [45].

Koaktivatorer er store proteiner som inneholder en eller flere kjernereseptor (NR)-bokser som består av en konserverte LXXLL sekvens, hvor L er aminosyren leucin og X er en vilkårlig aminosyre. Når en agonist er bundet til reseptoren vil NR-boksene i koaktivatoren interagere med AF-2 regionen i reseptorene og resultere i aktivering av gentranskripsjonen [20, 46]. Det finnes to ulike grupper koaktivatorer, primære og sekundære koaktivatorer. De primære koaktivatorene interagerer direkte med reseptoren, ved at de har histon acetyltransferase (HAT)- eller histon metyltransferase (HMT)-aktivitet, som vil remodulere kromatinstrukturen slik at DNA pakkes ut og er tilgjengelig for transkripsjon. De sekundære koaktivatorene danner multiproteinkomplekser, som fungerer som bindingssteder eller molekylære broer mellom kjernereseptorene og det transkripsjonelle maskineriet. Korepressorer har eller rekrutterer histon deacetylasen (HDAC) eller andre enzymer, som sørger for at kromatinstrukturen holdes på plass slik at gentranskripsjonen undertrykkes [46].

De ulike isoformene av PPAR regulerer spesifikke målgener i tillegg til at de utviser en vesentlig grad av overlapping [49]. Totalt sett spiller PPAR-familien sentrale roller i regulering av lipidmetabolismen og glukosehomeostasen, hvorav ulik grad av vevsdistribusjon og spesifikke målgener gir opphav til forskjeller i effekter mellom de ulike isoformene [20, 45, 46, 49, 50]. Dressel et al. har foreslått at PPAR spiller forskjellige roller i skjelettmuskel, hvor PPAR β ble vist til å øke uttrykket av gener involvert i fettsyreoksidasjon, kolesterol-effluks og energiavkobling, i motsetning til PPAR α som ble vist til å øke uttrykket av gener involvert i fruktoseopptak og glykogensyntese, mens PPAR γ økte uttrykket av gener involvert i glukoseopptak, fettsyresyntese og lipidlagring [51].

1.4.1 PPAR α

PPAR α er primært uttrykt i vev hvor store mengder frie fettsyrer metaboliseres, slik som lever, skjelettmuskel, nyrer og hjerte [49]. PPAR α spiller en sentral rolle i reguleringen av fettsyreoksidasjonen i lever [46]. I humane myotuber *in vitro* har PPAR α blitt vist å være involvert i reguleringen av lipidmetabolismen, ved å øke oksidasjon av lipider og redusere akkumulering av TG [52]. For å undersøke betydningen av rollen til PPAR α i lipidhomeostasen i skjelettmuskel ble det laget PPAR α -knockout-mus, og studier på disse dyrene viste at PPAR α ikke er avgjørende for å opprettholde lipidhomeostasen [53]. PPAR α er også involvert i glukosemetabolismen, og det har blitt vist at overuttrykk av PPAR α i skjelettmuskel hos mus resulterte i redusert opptak av glukose i skjelettmuskel og insulinresistens, til tross for resistens mot diettindusert fedme [54]. Denne effekten på glukoseopptak, glykolyse og glukoseoksidasjon har blitt anslått til å skyldes en indirekte undertrykking av transkripsjonen av GLUT4-genet, som er en nøkkelkomponent i signalveien for insulin-mediert glukoseopptak (avsnitt 1.3.2) [54]. Det har også blitt vist at det foreligger et økt uttrykk av PPAR α i skjelettmuskel hos diabetiske rotter [55]. En viktig regulator av glukoseoksidasjonen er PDK 4, og stimulering av PPAR α i humane myotuber har blitt vist til å føre en oppregulering av PDK 4, som resulterer i hemming av PDH og dermed blokkering av glukoseoksidasjonen i mitokondriene [49].

1.4.2 PPAR β

PPAR β , også kalt PPAR δ , er uttrykt i de fleste vev, med høyest uttrykk i hjerne, milt, skjelettmuskel, tarm, lunger og binyrer [20, 51]. PPAR β er den isoformen av PPAR med høyest uttrykk i skjelettmuskel [20, 56]. Det foreligger trolig en høy grad av overlapping mellom målgenene til PPAR α og PPAR β i skjelettmuskel, da aktivering av PPAR β vil, på lik linje som aktivering av PPAR α , føre til oppregulering av en rekke gener involvert i opptak og oksidasjon av FFA, og resulterer dermed i en økt fettsyreoksidasjon [20, 49]. Det har, som nevnt tidligere, blitt vist at lipidhomeostasen i skjelettmuskel opprettholdes til tross for bortfall av PPAR α , og dette har ført til teorien om at PPAR β , på grunn av sitt høye uttrykk, vil være i stand til å kompensere for mangel av PPAR α med hensyn på regulering av lipidhomeostasen i skjelettmuskel [53].

I motsetning til PPAR α , har *in vitro*-studier på mus som uttrykte en konstitutiv aktiv form av PPAR β i skjelettmuskel blitt vist til å få en økt insulinsensitivitet, i tillegg til å være beskyttet

mot diettindusert fedme [17]. Det ble spekulert i om denne forskjellen kunne komme av forskjeller mellom de to isoformene med hensyn på deres målgenspesifisitet, eller om at den observerte forskjellen kunne tilskrives en høyere konstitutiv aktivitet av PPAR β hos de transgene musene benyttet i det aktuelle forsøket [54]. I tillegg ble det vist et lavere nivå av IMTG i skjelettmuskel fra de transgene musene, som har blitt foreslått til å kunne forklare den økte glukosetoleransen [17]. Aktivisering av PPAR β hos mus, ved hjelp av agonist eller konstitutiv aktiv PPAR β , ble også vist til å resultere i en transformasjon av muskelfibre fra type II- til type I-fibre, og det ble foreslått at aktivisering av PPAR β kunne spille en rolle i beskyttelse mot fedme og insulinresistens [17]. Overuttrykk av PPAR β i skjelettmuskel hos mus derimot, har ikke vist å føre til fibertransformasjon, og det ble foreslått at aktivisering av PPAR β var viktigere enn en økning i antallet reseptorer [17, 57]. Det er usikkert om fibertransformasjon kan skje i voksne mennesker, men det har blitt vist et høyere uttrykk av PPAR β , PPAR α og PPAR γ koaktivator-1 α (PGC1 α) hos personer med en høy andel type I-fibre [20, 58].

1.4.3 PPAR γ

PPAR γ er hovedsakelig uttrykt i fettvev, hvor den fremmer adipogenese og lipidlagering, men finnes også uttrykt i lever og skjelettmuskel [45, 50]. Det har blitt funnet en korrelasjon mellom uttrykket av PPAR γ i skjelettmuskelvev og fedme og type 2-diabetes, og det har resultert i en hypotese om at deler av mengden PPAR γ detektert kan komme fra adipocytter inne i selve muskelen [47]. PPAR γ er den isoformen av PPAR med lavest uttrykk i skjelettmuskel, og dens mulige roller har blant annet blitt undersøkt i en studie hvor det ble opprettet mus som manglet PPAR γ i skjelettmuskel [47, 59]. Disse knockout-musene utviklet en økt mengde fettvev og en mild form for insulinresistens, men det ble vist at energihomeostasen og det insulin-medierte glukoseopptaket i skjelettmuskel var ikke affisert. Forfatterne konkluderte med at mangelen på PPAR γ resulterte i at lipider fra skjelettmuskel ble sendt til lever og fettvev, hvor det resulterte i hepatisk insulinresistens og økt mengde fettvev [59]. Hos mennesker har det blitt vist at personer med mutasjoner i genet som koder for PPAR γ er rammet av fedme [60]. Det har også blitt foreslått at aktivisering av PPAR γ øker uttrykket av glukosetransportørene GLUT1 og GLUT4 i muskel og fettvev [61].

1.4.4 PPAR og modulering av fettsyremetabolismen

Modulering av fettsyremetabolismen i skjelettmuskel har blitt foreslått som et mulig angrepspunkt for nye legemidler for behandling av insulinresistens og metabolske sykdommer. En strategi for dette er å redusere fettsyreoksidasjonen i skjelettmuskel, ved å redusere tilførselen og opptaket av FFA i skjelettmuskel [9].

Fibrater er en gruppe PPAR α -agonister som benyttes i behandling av hypertriglyseridemi i en rekke land [45, 49]. I Norge er derimot ingen fibrater markedsført [62]. Aktivisering av PPAR α i lever fører til økt opptak og oksidasjon i leveren og dermed en lavere plasmakonsentrasjon av FFA og TG [9, 49]. Mindre blir da tilgjengelig for opptak i skjelettmuskel, og kan derfor føre til en redusert fettsyreoksidasjon og en økt glukoseoksidasjon [9]. Direkte aktivisering av PPAR α i skjelettmuskel vil derimot føre til økt opptak og oksidasjon av FFA, som vil redusere glukoseoksidasjonen og potensielt forverre insulinresistens [54].

Thiazolidinedioner (TZD) er en gruppe legemidler som aktiverer PPAR γ , og disse benyttes i behandling av type 2-diabetes. De har blitt vist til å bedre insulinsensitiviteten og glukosetoleransen og redusere visceralt fedme, og på denne måten forsinke utviklingen av type 2-diabetes [63]. TZD aktiverer PPAR γ primært i fettvevet, og fører til økt opptak av FFA og et økt fettlager. TZD øker i tillegg forbruket av glyserol, som da fører til en økt produksjon av TG og redusert frisetelse av FFA fra fettvevet. På denne måten holdes plasmakonsentrasjonen av FFA lav og mindre blir tilgjengelig for opptak i skjelettmuskel, slik at fettsyreoksidasjonen reduseres og glukoseoksidasjonen økes [9].

I motsetning til PPAR α og PPAR γ , finnes det ingen PPAR β -agonister i klinisk bruk [20]. Mindre er kjent om aktivisering av PPAR β , men i *in vitro*-dyrestudier har PPAR β -aktivisering blitt vist til å føre til økt uttrykk av gener involvert i både opptak og oksidasjon av fettsyrer i skjelettmuskel og en økning i fettsyreoksidasjonen i skjelettmuskel [56, 57].

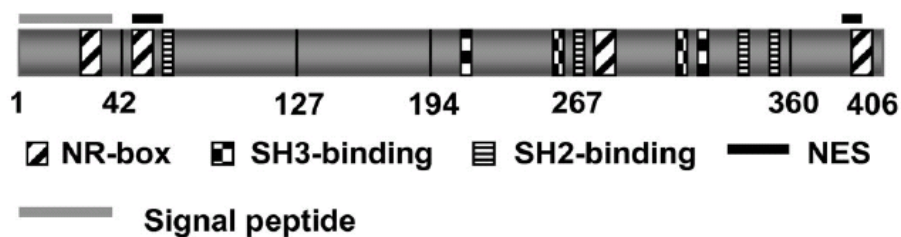
1.5 NCU-G1

Nyrepredominant protein, NCU-G1, ble oppdaget av Eskild et al. under deres arbeid med å studere interaksjoner mellom kjerneproteiner og promotorregionen til genet som koder for human cellulært retinol-bindende protein-1 (hCRBP1) [64]. Videre studier viste at to av kjerneproteinene som interagerte med en kjent transkripsjonsfaktorbindende-sekvens, «footprint1» (FP1), var ukjente [65]. Ett av disse proteinene ble senere identifisert av Steffensen et al. til å være den humane formen av NCU-G1 (hNCU-G1) [66]. Videre arbeid med hNCU-G1 viste at genet som koder for hNCU-G1 så ut til å være høyt konservert, og på proteinnivå ble det vist at det forelå en komplett konservering av mer enn 25 % av aminosyrene fra mygg til menneske. Dette kan tyde på at NCU-G1 har en viktig biologisk rolle [29, 66]. Selve proteinet, hNCU-G1, består av 406 aminosyrer og har en estimert molekylvekt på 43,8 kDa. Så langt har ingen likheter til andre kjente humane proteiner blitt funnet, som kan tyde på at hNCU-G1 er unikt [66]. På mRNA-nivå har det blitt vist at NCU-G1, i både mus og menneske, er uttrykt i de fleste vev, og det er enighet om at NCU-G1 er høyt uttrykk i nyrer [66-68]. I skjelettmuskel derimot, er det uenighet i litteraturen om hvorvidt det er uttrykt eller ikke [66, 68].

Siden NCU-G1 først ble funnet i kjernefraksjoner [64], ble det arbeidet med teorien om at NCU-G1 var et kjerneprotein [66]. Det ble vist at hNCU-G1 hovedsakelig var å finne i kjernen og de små mengdene funnet i cytosol ble foreslått til å skyldes en mulig lekkasje fra kjernen under isoleringsprosedyren [66]. Til tross for dette ble det ikke blitt funnet noen sekvenser for et kjernelokaliseringssignal (NLS), og det er derfor ukjent hvordan NCU-G1 translokerer fra cytosol til kjernen. Derimot ble det funnet to potensielle sekvenser for kjerneeksportsignaler (NES) (figur 1.6). En av teoriene for NCU-G1s translokasjon til kjernen baseres på at siden NCU-G1 er et lavmolekylært protein, vil det være i stand til å passere gjennom kjerneporer ved enkel diffusjon. Inne i cellene kan da NCU-G1 interagere med et NES-maskeringsprotein som da vil holde NCU-G1 på plass inne i kjernen. En annen teori er en såkalt «piggy-back»-mekanisme, hvor tildekning av NES er involvert i translokasjon til kjernen [66].

1.5.1 Mulige funksjoner til NCU-G1

Steffensen et al. har foreslått en rekke mulige funksjonelle motiver i hNCU-G1 (figur 1.6), men de fant ikke likheter til verken kjente transskripsjonsaktiverende-domener, DNA-bindende motiver eller regioner med enzymatisk aktivitet [66]. Til tross for dette ble det vist at hNCU-G1 har fire NR-bokser med signatursekvensen LXXLL (avsnitt 1.4), som også har blitt funnet hos en rekke koregulatorer, som for eksempel PGC1 α [66, 69]. Tilstedeværelsen av slike NR-bokser har blitt vist til å være avgjørende og tilstrekkelig for interaksjon med kjernereseptorer [46]. Det ble også funnet fire potensielle Src-homologi 3 (SH3)-interagerende-domener og fire potensielle Src-homologi 2 (SH2)-interagerende-domener i hNCU-G1, som kan tyde på mulige interaksjoner med andre proteiner [66]. Det er fortsatt ukjent hvilke funksjoner NCU-G1 har i cellen, men så langt har tre mulige funksjoner blitt undersøkt: transkripsjonsfaktor, koaktivator for kjernereseptorer og lysosomalt membranprotein [66, 68].



Figur 1.6: Potensielle funksjonelle motiver i hNCU-G1. I menneske har det blitt funnet fire kjernereseptor (NR)-bokser, fire Src-homologi 3 (SH3)-interagerende-domener, fire Src-homologi 2 (SH2)-interagerende-domener og to kjerneeksportssignaler (NES). Modifisert fra [66].

hNCU-G1 som mulig koaktivator for kjernereseptorer

Tilstedeværelsen av NR-bokser i hNCU-G1 kan, som nevnt tidligere, tyde på en mulig funksjon som koregulator for kjernereseptorer. Steffensen et al. fant at når hNCU-G1 og PPAR α ble uttrykt samtidig førte det til økt transkripsjon fra en promotor inneholdende et PPRE fra et kjent PPAR α -målgen, acyl-CoA oksidase. Det ble derfor foreslått en hypotese om at hNCU-G1 kan fungere som en koaktivator for PPAR α [66]. Interaksjonen mellom NR-boksene i koaktivatorene og kjernereseptorenes AF-2-domener har blitt vist til å kreve ligandindusert konformasjonsendring av AF-2-domenene, og for hNCU-G1 ble det vist at aktiveringen av PPAR α var ligandavhengig og at NR-boksene var involvert [20, 66]. Koaktivatorer kan, som nevnt i avsnitt 1.4, deles inn i to typer, primære og sekundære koaktivatorer [46]. Steffensen et al. fant ingen direkte interaksjon mellom hNCU-G1 og

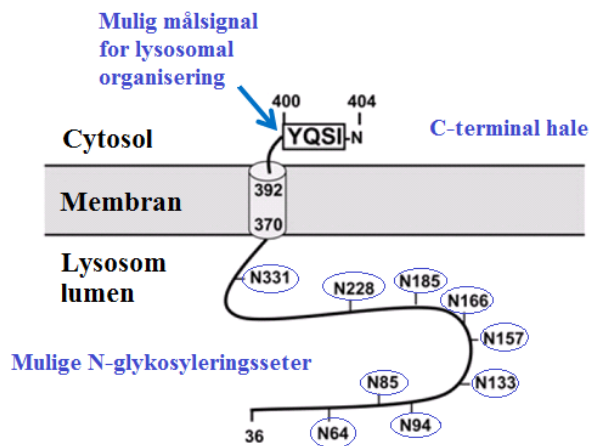
PPAR α , som kan tyde på at NCU-G1 er en sekundær koaktivator. Det ble også vist at NCU-G1 kolokaliserte med PPAR α inne i kjernen. Siden de fleste kjente koregulatorene er større enn hNCU-G1 og hNCU-G1 verken har domener for enzymaktivitet eller transkripsjonell aktivering, ble det foreslått en hypotese om at hNCU-G1 utøver sin effekt via interaksjoner med andre proteiner ved hjelp av de SH3-interagerende domenene [66].

hNCU-G1 som transkripsjonsfaktor

Steffensen et al. viste også at hNCU-G1 har evne til å binde seg spesifikt til en kjent transkripsjonsfaktorbindende sekvens, FP1, i hCRBP1-promotoren og aktivere transkripsjon fra denne promotoren [64, 66]. Denne evnen til å binde seg til DNA kan tyde på at hNCU-G1 kan fungere som en transkripsjonsfaktor. Til tross for dette fant ikke Steffensen et al. noen transkripsjonsaktiverende-domener eller DNA-bindende-domener i hNCU-G1, som er viktige regioner for transkripsjonsfaktorer. Det ble derfor foreslått at andre ukjente regioner med andre aktiviteter kunne være involvert [66].

hNCU-G1 som et lysosomalt membranprotein

I en studie utført av Schieweck et al., for å finne mulige lysosomale membranproteiner fra human placenta, ble hNCU-G1 funnet å være en mulig kandidat [68]. Lysosomer er membranbegrensede organeller som degraderer intra- og ekstracellulært materiale [29]. Fra en bioinformatisk analyse ble en mulig struktur til NCU-G1 fra mus (mNCU-G1) utledet. Det ble anslått at mNCU-G1 hadde et hydrofobt, N-terminalt signalpeptid (aminosyre 1 – 35), og den foreslåtte strukturen etter avspaltning av signalpeptidet er vist i figur 1.7. Hoveddelen av proteinet (aminosyre 36 – 369) ble foreslått til å inneholde ni potensielle N-glykosyleringsseter, i tillegg til et transmembranalt segment (aminosyre 370 – 392) og en C-terminal hale (aminosyre 393 – 404). Forut for C-terminalen ble det funnet et potensielt målsignal for lysosomal organisering. På bakgrunn av dette foreslo Schieweck et al. en hypotese om at NCU-G1 er et lysosomalt membranprotein [68].



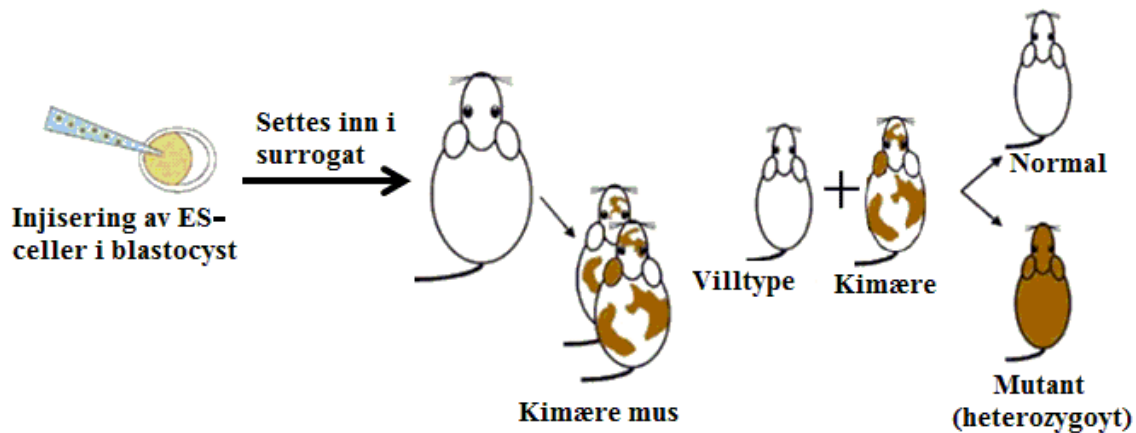
Figur 1.7: Mulig struktur for mNCU-G1 etter avspaltning av signalpeptid. Det ble predikert at mNCU-G1 etter avspaltning av et signalpeptid (aminosyre 1-35), bestod av en hoveddel (aminosyre 36-369) med 9 mulige N-glykosyleringsseter, et transmembranalt segmentet (aminosyre 370-392), et potensielt målsignal for lysosomal organisering (aminosyre 400-403) og en C-terminal hale (aminosyre 393 til 404). Modifisert fra [68].

Schieweck et al. klarte kun å detektere proteinuttrykk av mNCU-G1 i lysosomene, men da med en høyere molekylvekt, på omtrent 75 kDa. Denne økningen i molekylvekt ble anslått til å skyldes en omfattende glykosylering, som er vanlig for lysosomale membranproteiner [68]. Hypotesen om at NCU-G1 er et lysosomalt membranprotein har fått støtte av en annen forskningsgruppe, Sardiello et al., som viste at humant NCU-G1 hadde en lysosomal lokalisering og at det trolig var involvert i reguleringen av lysosomal biogenese og funksjon [70].

1.5.2 Opprettelse av NCU-G1-knockout-mus

Knockout (KO)- mus er genetisk modifiserte mus hvor funksjonen til et bestemt gen er eliminert. Slike modellsystemer er egnede redskaper for å studere funksjonen til gener, ved at konsekvensene av genets fravær kan studeres [71, 72]. Kong et al. laget NCU-G1-knockout-mus ved hjelp av «gene trapping» i embryonale stamceller (ES-celler), hvor en DNA-sekvens inneholdende et stop-kodon ble satt inn i det første i intronet i NCU-G1-genet. Dette vil forhindre at hele NCU-G1-genet blir transkribert, og på denne måten sørge for at genets funksjon uteblir. ES-cellene ble injisert inn i blastocyster, som da ville inneholde stamceller fra både blastocysten og fra knockout-stamcellene, og senere implantert i livmoren til en hunnmus (figur 1.8). De resulterende avkommene ble kimære, hvorav noen av disse produserte egg eller spermier fra knockout-stamcellene. Ved parring med villtype-mus resulterte dette i at noen av avkommene hadde en kopi av knockout-genet i alle cellene sine, såkalt heterozygot for NCU-G1-genet. Tilstedeværelsen av den såkalte «gen-trapen» i disse dyrene ble undersøkt ved hjelp av polymerase-kjedereaksjon (PCR). Videre parring av heterozygote mus resulterte i at noen av avkommene ble homozygote, som innebærer et

fraværende funksjonelt NCU-G1-gen. Seleksjonen av homozygote mus ble verifisert ved hjelp av PCR [71].



Figur 1.8: Generering av knockout-mus. Embryonale stamceller (ES-celler) ble injisert inn i en blastocyst som ble satt inn i livmoren til en hunnmus. Resulterende avkom ble kimære, og parring av disse med villtype-mus gav blant annet opphav til mus som var heterozygote for det aktuelle genet. Videre parring av disse heterozygote musene vil kunne gi opphav til homozygote mus, det vil si knockout-mus. For å visuelt bestemme bidraget fra ES-cellene i musene, kan ES-cellene merkes genetisk med pelsfarge. Modifisert fra [73].

Disse NCU-G1-knockout-musene ble vist til å være fertile og vokse like raskt som sine villtype-søsken frem til en alder på omtrent 4 måneder. Allerede ved 2 måneders alder utviklet knockout-musene leverfibrose, men de ble allikevel funnet til å leve til de ble gamle. Ved en alder på 6 måneder ble det funnet at knockout-musene omtrent veide 10 % mindre enn jevnaldrende villtype-mus [71]. Siden NCU-G1 har blitt vist til å være høyt uttrykt i nyrer, ble en «Affymetrix Microarray»-analyse på nyrene utført. Det ble predikert at en rekke PPAR-kontrollerte signalveier var nedregulert i nyrene hos knockout-musene, og dette ble bekreftet ved hjelp av real-time RT-PCR [74]. Preliminære studier på fibertypesammensetningen hos disse dyrene viste at det forelå en tendens til en høyere andel type IIb-fibre i *musculus extensor digitorum longus* (EDL-muskel) og en redusert fibertykkelse i *musculus soleus* (SOL-muskel) sammenlignet med villtype-mus [75].

1.6 Substanser benyttet i denne oppgaven

1.6.1 Energisubstanser

Skjelettmuskel benytter både FFA og glukose som kilder til sin energiproduksjon (avsnitt 1.3.1 og 1.3.2) For å undersøke myotubenes energimetabolisme ble derfor glukose og oljesyre tilsatt akutt. Oljesyre er en enumettet fettsyre (MUFA) med en kjedelengde på 18 karbonatomer (C18:1, ω -9) og er den fettsyren det er mest av i TG, fosfolipider og kolesterolistere [6, 26]. Glukose er et monosakkarid bestående av seks karbonatomer [29].

1.6.2 GW 7647

GW 7647 er en potent, selektiv PPAR α -agonist, som kan benyttes til å studere effekter av PPAR α i celler fra både gnagere og mennesker *in vitro* [76]. *In vitro*-studier på humane myotuber har vist at forbehandling med GW 7647 i 2 dager resulterte i en doseavhengig økning i oljesyreoksidasjonen, en reduksjon i akkumuleringen av TG og et økt uttrykk av gener involvert i fettsyreoksidasjonen i skjelettmuskel [52].

1.6.3 GW 501516

GW 501516 er en potent, selektiv PPAR β -agonist [77]. *In vitro*-studier på myotuber fra mus viste at forbehandling med GW 501516 i 2 dager økte uttrykket av en rekke gener involvert i energimetabolismen i skjelettmuskel [51]. Både *in vitro*- og *in vivo*-studier med rotter og mus har vist at aktivering av PPAR β , ved hjelp av GW 501516, økte fettsyreoksidasjonen i skjelettmuskel og reduserte intramuskulær lipidakkumulering [56].

1.6.4 Karbonylcyanid-p-trifluorometoksyfenylhydrazon

Karbonylcyanid-p-trifluorometoksyfenylhydrazon (FCCP) er et kjemisk stoff som kan hemme koblingen mellom elektrontransport og fosforyleringsreaksjoner i mitokondriene, og på denne måten hemme ATP-syntesen uten å påvirke elektrontransportkjeden og ATP-syntase [78]. Normalt vil høyenergielektroner, som NADH og FADH₂ fra glykolyse, Krebs syklus og β -oksidasjon, transporteres langs elektrontransportkjeden og danne en protongradient som driver fosforyleringen av ADP til ATP ved hjelp av ATP-syntase (avsnitt 1.3.1 og 1.3.2) [29]. I nærvær av FCCP vil denne koblingen brytes, ved at FCCP transporterer protoner over

mitokondriemembranen og reduserer protongradienten [78]. Dette resulterer i hemming av ATP-syntesen uten at elektrontransporten påvirkes, og dermed vil det være mulig å oppnå maksimal oksidativ fosforylering [78, 79]. *In vitro* kan FCCP benyttes til å bestemme myotubers maksimale mitokondriekapasitet [79]. Effekten av FCCP kan benyttes som et estimat på myotubenes reservekapasitet, og beregnes som differansen mellom oksidasjonen med FCCP og oksidasjonen uten FCCP (FCCP – BASAL). For å estimere hvor stor andel av reservekapasiteten myotubene benyttet seg kan brøken BASAL/FCCP beregnes.

1.7 Formålet med denne masteroppgaven

NCU-G1 er et protein med ukjent funksjon, og flere teorier om dets mulige roller har blitt foreslått [66, 68, 70]. For å undersøke proteinets funksjon ble det laget NCU-G1-knockout-mus [71]. Preliminære studier på disse knockout-musene tydet på at de hadde en høyere andel type IIb-fibre i *musculus extensor digitorum longus* (EDL-muskel) og en redusert fibertykkelse i *musculus soleus* (SOL-muskelen), sammenlignet med deres villtype-søsken [75]. I tillegg ble det predikert at en rekke PPAR-regulerte signalveier var nedregulert i nyrene til disse dyrene, hvor NCU-G1 normalt er høyt uttrykt [74]. Samlet kan dette tyde på at NCU-G1 kan ha en rolle i reguleringen av energimetabolismen i skjelettmuskel. I denne masteroppgaven ble det arbeidet videre med denne teorien, og NCU-G1s rolle i energimetabolismen i skjelettmuskel ble studert *in vitro* ved hjelp av myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus. Følgende mål for oppgaven satt:

Etablere kulturer av satellittceller fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus:

- Isolere, rense opp og oppskalere satellittceller for videre studier.

Studere og sammenligne energimetabolismen hos myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus ved å undersøke:

- Akkumulering og oksidasjon av både oljesyre og glukose.
- Substratpreferanse, suppressibilitet og maksimal mitokondriekapasitet.
- Uttrykket av et utvalg gener involvert i energimetabolismen i skjelettmuskel.

Studere og sammenligne effekt av PPAR-agonister på energimetabolismen hos myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus ved å undersøke:

- Effekt av PPAR α - og PPAR β -agonister på akkumulering og oksidasjon av oljesyre.
- Effekt av PPAR α - og PPAR β -agonister på uttrykket av kjente PPAR-målgener.

Studere uttrykket av NCU-G1 i humane myotuber:

- Undersøke uttrykket av NCU-G1 i myotuber fra normalvektige, overvektige med normal glukosetoleranse og overvektige med type 2-diabetes.

2 Materialer og metoder

2.1 Materialer

Ham's F10 Glutamax nutrient mixture, Dulbecco's Modified Eagle medium med Glutamax (1g/L glukose), Hanks Balance Salt Solution (HBSS), føtalt storfeserum (FBS), penicillin/streptomycin (10000 IE/ml), Fungizone® (250 µg/ml amphotericin), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), trypsin, hesteserum og Dulbecco's Phosphate Buffered Salin (DPBS m/Ca²⁺ og Mg²⁺) ble kjøpt fra Gibco®, Life Technologies (Paisley, Scotland, UK). GW 501516 ble fremstilt av Calin Ciocoiu, Avdeling for farmasøytisk kjemi, farmasøytisk institutt. GW 7647 ble kjøpt fra Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). Collagenase II fra PAA laboratories ble kjøpt fra Pedersen og sønn AS (Norge). Liberase Reasearch Grade ble kjøpt fra Roche Applied Science (USA). L-carnitin, bovint serumalbumin (BSA), β-merkaptotanol, HEPES, karbonylcyanid p-trifluorometoksyfenyl hydrason (FCCP), Etidiumbromid, Tryptanblått 0,4 % løsning, oljesyre (OA), Collagen I, Tween 20 og dimetylsulfoksid (DMSO) HYBRI-MAX® ble kjøpt fra Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). [1-¹⁴]oljesyre (54,4 mCi/mmol) og D-[¹⁴C(U)]glukose (2,9 mCi/mmol) ble kjøpt fra PerkinElmer (Boston, USA). OptiPhase Supermix®, Unifilter®-96 GF/B og TopSeal®-A gjennomsiktig film ble kjøpt fra PerkinElmer (Shelton, Scotland, USA). BD Matrigel™ matriks, BD Biocoat™ Collagen I 25 cm² celleflasker og BD Falcon™ cell stainer 100 µM nylonfilter ble kjøpt fra BD Biosciences (Bedford, MA, USA). 96-brønners brett med flat bunn fra NUNC ble kjøpt fra Thermo Scientific (Danmark). 96-brønners Isoplate® ble kjøpt fra Wallac OY (Turku, Finland). 96-brønners brett, 25 cm² celleflasker, 75 cm² celleflasker kjøpt fra NUNC (Roskilde, Danmark). NaOH, glyserol, tris-base og Na₂PO₄·2H₂O ble kjøpt fra VWR (Poole, England). NaCl, KCl, KH₂PO₄, iseddik (CH₃COOH) og D-glukose ble kjøpt fra Merck (Darmstadt, Tyskland). Agilent Total RNA Isolation Mini Kit var fra Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, LightCycler® 480 SYBR Green I Master, LightCycler® 480 96-brønners plate og LightCycler® 480 Multiwell Sealing Foil ble kjøpt fra Roche Applied Science (USA). Primere til myotuber fra mus (SCD 1, SCD 2, PGC1α, NCU-G1, PPARα, PPARβ, PPARγ, CD36, PDK 4, β-aktin) ble kjøpt fra DNA Technology AS (Danmark). Primere til myotuber fra mus (Anptl4 og PDK 4) ble kjøpt fra Life Technologies (Carlsbad, CA). Primere til humane myotuber (NCU-G1 og β-aktin) ble kjøpt fra DNA Technology AS (Danmark). SeaKem® LE Agarose ble kjøpt fra Lonza (Rockland, ME, USA). Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bromfenylblått, Natriumdodekylsulfat (SDS) og Polyvinylidendifluorid (PVDF)-membran ble kjøpt fra BioRad Laboratories (Hercules, CA, USA). GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder og 6x Loading Dye fra Fermentas (Tyskland). Pierce ® BCA Protein Assay Kit og PageRuler™ prestained proteinladder ble kjøpt fra Thermo Scientific (USA). ECL Plus Western Blot Detection System ble kjøpt fra GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). iBlot® 7-Minute Blotting System, NuPAGE Bis-Tri Mini gel, NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer, Anti-ANGPTL4 polyclonal antibody (katalognr: 40-9800) og HPR-Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) DS Grade (katalognr: 65-6120) ble kjøpt fra Life Technologies (USA). β-actin polyclonal antibody (katalognr: SC-130656) ble kjøpt fra Santa Cruz biotechnology Inc. Skim Milk powder ble kjøpt fra Fluka® Analytical. Alle andre kjemikalier og reagenser som ble benyttet var standard kommersielle materialer av analytisk kvalitet.

2.2 Opprettelse av cellebank

Opprettelse av en cellebank er essensielt for all forskning som involverer celler. Fra hver enkelt muskelbiopsi, vil kun et lite antall celler bli isolert. Forskning på cellekulturer krever ofte et høyt antall celler, i tillegg til at det er nødvendig å utføre flere forsøk på samme donor for å kunne trekke mest mulig sikre konklusjoner. I denne masteroppgaven måtte derfor de isolerte cellene, etter en omfattende opprensing, oppskaleres før forsøkene kunne starte. Etter hvert som cellene ble oppskalert ble de frosset ned i en nitrogentank for videre oppbevaring.

2.2.1 Isolering av satellittceller fra mus

Isoleringen av satellittceller fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus fulgte prinsippene beskrevet av Hessvik et al. [80]. Totalt 7 mus, hvorav 4 knockout- og 3 villtype-mus (for donorkarakteristikk se appendiks 1.1.), ble forskriftsmessig avlivet ved nakkestrekk. Baklemmene ble dissekert ut under aseptiske forhold, og midlertidig oppbevart i 20 ml iskald «Dulbecco's Modified Eagle medium» med 1g/L glukose (DMEM-medium). Derifra ble muskelbiopsien overført til en petriskål og skylt med 10 ml «Hanks Balance Salt Solution» (HBSS) som var varmet til 37 °C, før tilsetning av 10 ml «Hams F10 Glutamax medium». Muskelvevet ble separert fra bein og sener ved hjelp av to sterile skalpeller og kuttet opp i små biter, før det ble overført til et 50 ml sentrifugerør sammen med 10 ml HBSS. Etter kort henstand og påfølgende sedimentasjon ble overflødig væske fjernet. Bindevevet ble brutt ned ved å inkubere vevssuspensjonen ved 37 °C med 5 ml DMEM-medium tilsatt 2 % Collagenase II i minst 90 minutter med jevnlig røring hvert 15. minutt. Deretter ble løsningen sentrifugert i 1 minutt ved 1800 rpm (500 x g), supernatanten fjernet og pelleten vasket med 10 ml HBSS som var varmet til 37 °C. Sentrifugering og vasking med 10 ml HBSS ble gjentatt totalt tre ganger, for å fjerne rester av Collagenase II. Pelleten ble tilsatt 10 ml HBSS med 0,3 % Liberase og inkubert ved 37 °C i 30 minutter med jevn røring omtrent hvert 5. minutt, for å fordøye muskelvevet ytterligere og frisette satellittcellene [81]. Etter inkubasjonen ble 1 ml føtalt storfeserum (FBS) tilsatt for å inaktivere liberasen [81]. De tyngste forurensingene ble fjernet ved å sentrifugere løsningen i 1 minutt ved 1800 rpm. Supernatanten ble filtrert gjennom et BD Falcon™ «cell strainer»-nylonfilter på 100 µm, og filtratet ble sentrifugert ved 2500 rpm (1000 x g) i 5 minutter for å fjerne eventuelle forurensinger, som ufordøyd vev, hud eller hår, og for å samle satellittcellene i pelleten. Til

slutt ble pelleten resuspendert i 4 ml proliferasjonsmedium (appendiks 2.1.) og overført til en BD BioCoat™ Collagen I 25 cm² celleflaske og dyrket ved 37 °C, 5 % CO₂.

2.2.2 Opprensing av satellittceller

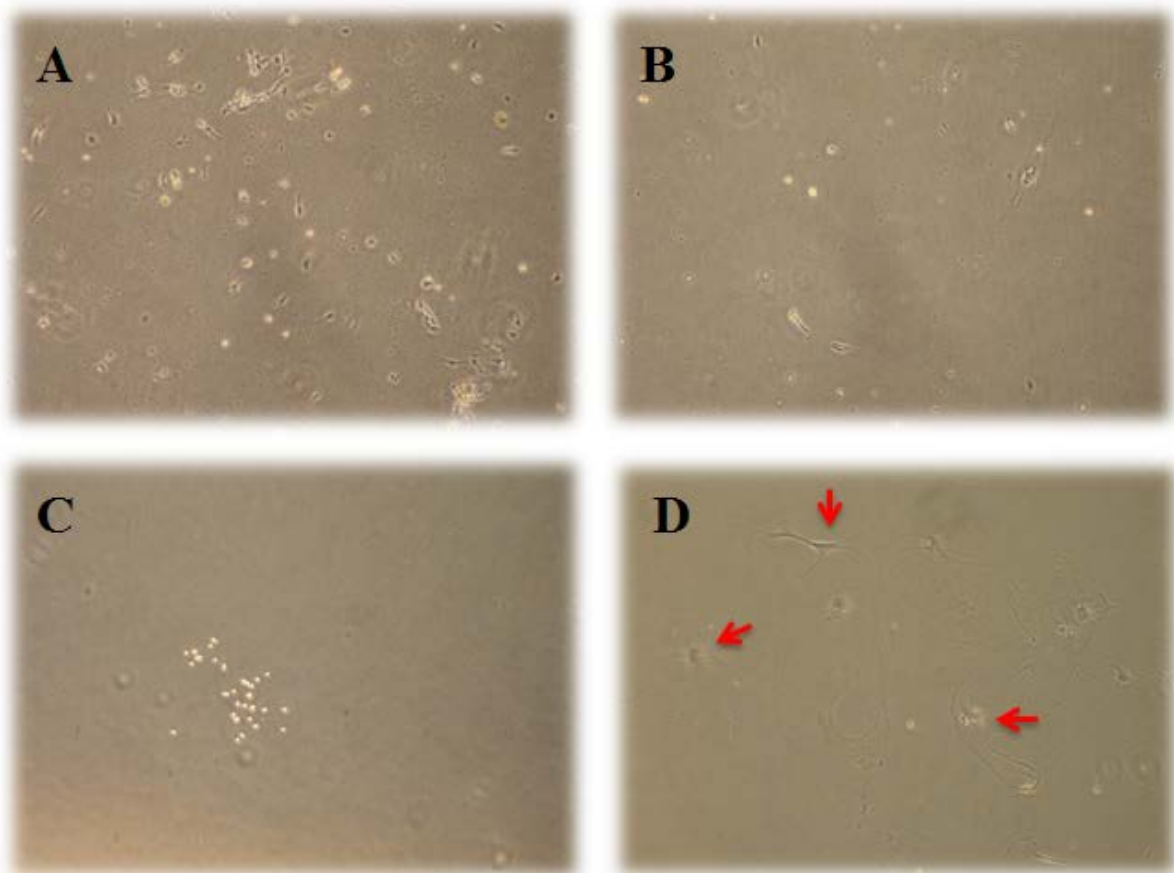
Isolerte primærkulturer består hovedsakelig av satellittceller og fibroblaster [82]. Satellittceller er en gruppe myogene forløperceller som ved aktivering kan differensieres til myoblaster, som kan fusjonere til myotuber, og til slutt kan differensieres til modne skjelettmuskelfibre [14, 16]. Fibroblaster er en type bindevevscelle, som i respons til vevsskade kan proliferere og migrere inn i det skadede vevet, hvor de sekreterer en ekstracellulær matriks som er rik på kollagen, som da hjelper til å isolere og reparere vevet [83]. I denne masteroppgaven skulle prosesser i isolerte muskelceller studeres *in vitro*, og det var derfor ønskelig å separere satellittcellene fra fibroblastene. I løpet av de første passasjene av primærkulturen (figur 2.1) ble flere metoder, som beskrevet av Springer et al., benyttet for å separere satellittcellene fra fibroblastene [82]. For å begrense vekst av fibroblaster ble proliferasjonsmedium benyttet, da dette mediet favoriserer vekst av satellittceller. I de fire første passasjene av primærkulturen ble celleflaskene byttet minst hver 5. dag [82].

Siden satellittceller løsner lettere fra bunnen av celleflasken enn fibroblaster [82], ble dette utnyttet ved å splitte cellene uten trypsin. Etter fjerning av mediet ble cellene vasket med 2 ml HBSS 3 ganger. For å løsne satellittcellene fra bunnen ble 4 ml HBSS tilsatt og flaskene inkubert i 5-10 minutter ved 37 °C, 5 % CO₂, etterfulgt av et kraftig dunk i hver flaske og visuell kontroll under mikroskop. Cellesuspensjonen ble deretter overført til et 50 ml sentrifugerør og tilsatt 4 ml proliferasjonsmedium, før sentrifugering i 7 minutter ved 1800 rpm. Etter fjerning av supernatanten ble cellepelleten resuspendert i 2 ml proliferasjonsmedium, ved å pipettere opp og ned. Til slutt ble 2 ml proliferasjonsmedium ble tilsatt og cellene sådd ut på en ny BD BioCoat™ Collagen I 25 cm² celleflaske og dyrket ved 37 °C, 5 % CO₂.

I løpet av de tre første passasjene var det behov for å redusere antallet fibroblaster ytterligere, og “preplating”-metoden ble benyttet som et tilleggstrinn. I stedet for å så celsuspensjonene direkte ut på BD BioCoat™ Collagen I celleflasker, ble de i stedet sådd ut på ordinære celleflasker uten coating, fra NUNC, og inkubert i 15 minutter ved 37 °C, 5 % CO₂. Fibroblaster vil kunne adhere til bunnen av slike celleflasker i løpet av inkubasjonstiden, mens satellittceller vil forbli løse i mediet [82]. Mediet med de cellene som ikke hadde festet

seg ble derfor sådd ut på nye BD BioCoat™ Collagen I 25 cm² celleflasker og dyrket ved 37 °C, 5 % CO₂.

I tilfeller hvor celleflaskene var svært tette med fibroblaster og hvor, selv etter noen dagers dyrkning, en god del av satellittcellene ikke hadde festet seg til bunnen på celleflasken, ble mediet med de løse satellittcellene sådd ut på nye BD BioCoat™ Collagen I 25 cm² celleflasker og inkubert ved 37 °C, 5 % CO₂.



Figur 2.1: Satellittceller under opprensingsprosessen. Satellittceller isolert fra baklemmene til mus ved passasje 0 (A) undergikk en omfattende opprensingsprosedyre, og fra første splitting (B), til tredje splitting var det mulig å detektere en koloni med satellittceller (C). Målet med opprensingen var å separere satellittcellene fra fibroblastene (fremhevet med rød pil) (D). Bilder ble tatt med 4 x forstørrelse.

2.2.3 Oppskalering og splitting

Satellittcellene ble oppskalert når ingen fibroblaster var synlig under mikroskop. Det ble på dette tidspunktet foretatt et mediebytte fra proliferasjonsmedium til vekstmedium (appendiks 2.2.), for å fremme satellittcellenes vekst og redusere oppskaleringstiden [82]. Da cellene nådde 70 – 80 % konfluens ble de overført til en 75 cm² celleflaske med kollagen I-coating (appendiks 3.1.). For påfølgende splittinger ble celleflaskene splittet til to 75 cm² celleflasker med kollagen I-coating.

For å splitte cellene ble mediet fjernet og cellene vasket 3 ganger med 4 ml HBSS. Cellene ble løsnet fra bunnen ved å tilsette 5 ml 0,25 % trypsin og inkubere i 5-10 minutter ved 37 °C, 5 % CO₂, etterfulgt av et kraftig dunk i flasken og visuell kontroll under mikroskop. Cellesuspensjonen ble deretter overført til et 50 ml sentrifugerør, før celleflasken ble skylt grundig med 4 ml medium, ved å pipettere væsken over bunnen, for å få med resterende celler over i sentrifugerøret. Etter sentrifugering i 7 minutter ved 1800 rpm, ble supernatanten fjernet og cellepelletten resuspendert i 2 ml vekstmedium. Etter tilsetning av passende mengde vekstmedium, til totalt 12 ml til hver 75 cm² flaske, ble cellesuspensjonen sådd ut på nye 75 cm² celleflasker med kollagen I-coating og inkubert ved 37 °C, 5 % CO₂.

2.2.4 Telling av celler

Gjennom hele oppgaven ble «Countess™ Automated Cell Counter» fra Life Technologies benyttet til å telle antall levende celler. Et uttak fra den aktuelle cellesuspensjonen ble blandet med 0,4 % tryptanblått i forholdet 1:1 og overført til et tellekammer. Ved å bruke tryptanblått er tellemaskinen i stand til å skille mellom levende og døde celler, ved at døde celler farges blå. Dette skyldes at tryptanblått er et stort og vannløselig molekyl og vil ikke kunne krysse cellemembranen til intakte celler.

2.2.5 Frysing og tining av satellittceller

Etter hvert som cellene ble oppskalert ble de frosset ned i en nitrogentank, med en celletetthet på omtrent 1 x 10⁶ celler per ampulle. Ved frysing av satellittceller ble prosedyren for splitting fulgt frem til generering av en cellepellet (avsnitt 2.2.3.), som deretter ble resuspendert i 1 ml varmet vekstmedium. Antall levende celler ble bestemt som tidligere (avsnitt 2.2.4) og egnet mengde frysemedium (appendiks 2.3.) ble tilsatt. Frysemediet

inneholder det kryobeskyttende stoffet dimetylsulfoksid (DMSO) som hindrer at cellene sprekker ved for rask nedfrysning på grunn av iskrystalldannelse inne i cellene. Uttak på 1 ml av cellesuspensjonen ble overført til kryorør fra NUNC, som ble holdt på is frem til nedfrysingen. Cellene ble fryst ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i omtrent 30 minutter, før de ble overført til $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hvor de stod over natten. Neste dag ble cellene overført til nitrogentanken ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) for videre oppbevaring.

Ved uttak fra nitrogentanken ble satellittcellene tint raskt på vannbad ved $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, før cellesuspensjonen ble overført til et 50 ml sentrifugerør og tilsatt 5 ml vekstmedium dråpevis. Etter blanding ble cellesuspensjonen sentrifugert i 7 minutter ved 1800 rpm. Siden frysemediet inneholder DMSO, som er toksisk for cellene ved romtemperatur, ble supernatanten fjernet, før cellepelletten ble resuspendert i 2 ml vekstmedium. Etter tilsetning av passende mengde vekstmedium ble cellesuspensjonen sådd ut på 75 cm^2 celleflasker med kollagen I-coating og inkubert ved $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 .

2.3 Dyrking av celler til forsøk

2.3.1 Coating av forsøksbrett og -flasker med 2 % Matrigel

BD Matrigel™ Matriks ble fortynnet 1:50 i DMEM-medium rett fra kjøleskap. Egnet volum fortynnet Matrigel ble deretter overført til 96-brønners cellebrett eller 25 cm^2 flasker uten coating fra NUNC (tabell 2.1). Etter 1 times henstand ble overflødig coating fjernet og brettet eller flasken vasket 2 ganger med passende mengde DMEM-medium (tabell 2.1).

Tabell 2.1: Oversikt over egnede volumer for coating.

Følgende volumer ble benyttet til prosedyren for coating med Matrigel til forsøk.

Type	2 % Matrigel i DMEM (per brønn/flaske)	Vaskevolum (per brønn/flaske)
25 cm^2 flaske (NUNC)	2 ml	2 ml
96-brønner brett (NUNC)	50 μl	50 μl

2.3.2 Utsåing av satellittceller

Ved utsåing av satellittceller til forsøk ble antall levende celler bestemt (avsnitt 2.2.4), før egnet mengde vekstmedium ble tilsatt. Egnede celleantall og mediumvolumer for forsøksbrett- og –flasker benyttet i denne oppgaven er oppgitt i tabell 2.2. Satellittcellene ble sådd ut på celleflasker eller cellebrett coated med 2 % Matrigel (avsnitt 2.31.).

Tabell 2.2.: Oversikt over egnede celleantall og mediumvolumer ved utsåing av satellittceller til forsøk. Følgende celleantall og volumer ble benyttet til prosedyren for utsåing av satellittceller til forsøk.

Type	Celleantall (per brønn/flaske)	Mediumvolumer (per brønn/flaske)
96-brønners brett (NUNC)	10 000	100 µl
25 cm ² flaske (NUNC)	600 000	4 ml

2.3.3 Vekst av satellittceller og differensiering til myotuber

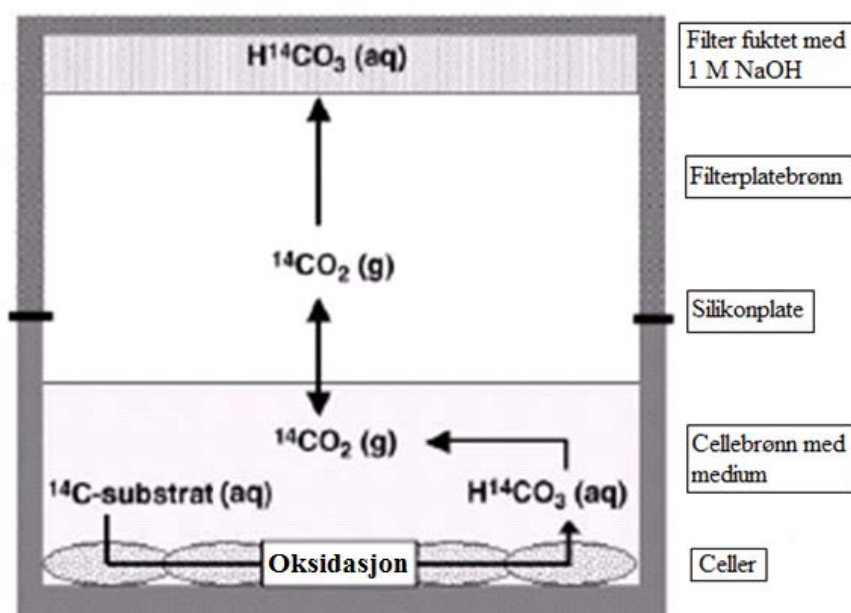
Vekstmedium ble byttet hver 2. - 3. dag, frem til satellittcellene nådde 70 – 80 % konfluens. På dette tidspunktet ble det byttet til differensieringsmedium (appendiks 2.4.), og cellene differensierte til flerkjernede myotuber. Differensieringsmediet ble byttet hver 2. dag og forsøk ble utført på dag 4. Eventuelle agonister (løst i DMSO) ble tilsatt på dag 2 etter differensieringstart, og til kontrollbehandling ble 0,1 % DMSO benyttet. Cellenes vekst og differensiering ble kontrollert visuelt ved hjelp av mikroskop og bilder ble tatt for dokumentasjon.

2.4 Substratoksidasjonsmetoden

Substratoksidasjonsmetoden er en metode som kan benyttes til å kvantifisere opptak og oksidasjon av [¹⁴C]-merkede substrater hos celler *in vitro* [84]. Denne metoden gir mulighet til å kunne studere eventuelle forskjeller mellom myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus med hensyn på opptak og oksidasjon av fettsyrer og glukose, og eventuell påvirkning av dette ved behandling med PPAR-agonister.

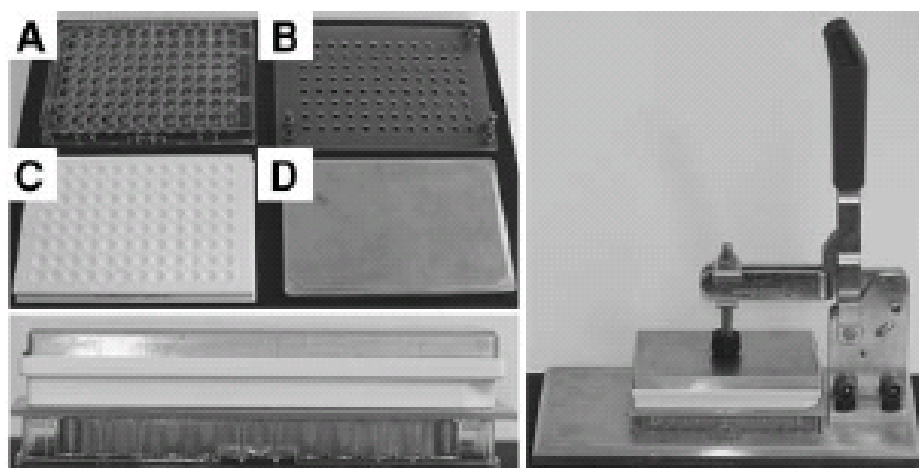
Metoden er utført som beskrevet av Wensaas et al. [84]. Prinsippet bak metoden er at cellene inkuberes med et medium inneholdende et [¹⁴C]-merket substrat (figur 2.2) [84]. Det [¹⁴C]-merkede substratet vil bli tatt opp av cellene og inngå i den cellulære respirasjonen for

dannelse av ATP (avsnitt 1.3.1 og 1.3.2). Radioaktiv glukose spaltes via glykolysen, til to pyruvat-molekyler som går inn i mitokondriene og omdannes til $[1-^{14}\text{C}]$ acetyl-CoA, mens radioaktiv oljesyre går direkte inn i mitokondriene og omdannes til $[1-^{14}\text{C}]$ acetyl-CoA via β -oksidasjon. $[1-^{14}\text{C}]$ acetyl-CoA vil deretter gå inn i Krebs syklus, hvor hver acetyl-gruppe oksideres til 2 molekyler $[1-^{14}\text{C}]\text{CO}_2$ (g), som frisettes som avfallsstoff [29]. Mengden $[1-^{14}\text{C}]\text{CO}_2$ (g) frisatt er derfor et mål på oksidasjonen av de $[^{14}\text{C}]$ -merkede substratene. For å få et kvantitativt uttrykk på oksidasjonen av de $[^{14}\text{C}]$ -merkede substratene benyttes et lufttett system, hvor den eneste muligheten for gassutveksling er gjennom et filter fuktet med 1 M natriumhydroksid (NaOH). NaOH vil reagere med $[1-^{14}\text{C}]\text{CO}_2$ (g) og danne $[1-^{14}\text{C}]\text{HCO}_3$ som foreligger i væskeform og vil kunne fanges opp av filteret [84].



Figur 2.2: Prinsippet bak substratoksidasjonsmetoden. $[^{14}\text{C}]$ -merkede substrater tas opp og oksideres i cellene, og $[1-^{14}\text{C}]\text{CO}_2$ (g) dannes som biprodukt. En filterplate fuktet med 1 M natriumhydroksid (NaOH) vil være i stand til å fange opp $[1-^{14}\text{C}]\text{CO}_2$ (g), ved at NaOH reagerer med $[^{14}\text{C}]\text{CO}_2$ (g) og danner $[1-^{14}\text{C}]\text{HCO}_3$ (aq). Modifisert fra [84].

Selve oppsettet for substratoksidasjonsmetoden er vist i figur 2.3. Før de ulike delene kan settes sammen må de varmes opp i et varmeskap. Cellebrettet plasseres nederst, og over skrues det fast en silikonplate for å stabilisere oppsettet. Når filteret fuktet i NaOH legges over, dannes det et lufttett system. En metallplate legges på toppen for å sørge for jevn trykkfordeling over hele oppsettet, og til slutt blir oppsettet lagt under trykk ved hjelp av et trappeapparat.



Figur 2.3: Oppsett for substratoksidasjonsmetoden. Oppsettet for substratoksidasjonsmetoden består av et cellebrett (A), en silikonplate med skruer (B), en filterplate (C) og en metallplate (D), som settes sammen (vises nederst til venstre i figuren). Oppsettet legges deretter under trykk av et trappeapparat (vises til høyre i figuren). Modifisert fra [84].

En viss andel av de [^{14}C]-merkede substratene som blir tatt opp av cellene vil ikke inngå i den cellulære respirasjonen, men forblir inne i cellen, såkalte celleassosierte substrater (CA). Disse celleassosierte substratene gir et estimat på graden av akkumulering, det vil si hvor mye av de [^{14}C]-merkede substratene som ble tatt opp i cellene, men som ikke ble oksidert. For å kvantifisere mengden celleassosierte substrater lyseres cellene etter endt trapping. Mengden [$1\text{-}^{14}\text{CO}_2$] fanget opp av filterplaten og mengden [^{14}C]-substrater i cellelysatsen måles ved hjelp av en β -scintillasjonsteller. Tilsetning av scintillasjonsvæske muliggjør deteksjon av antall desintegrasjoner fra [^{14}C]-atomene i form av antall lysglimt, slik at β -scintillasjonstellersen kan gi et kvantitativt mål på oksidasjon og akkumulering av [^{14}C]-merkede substrater. β -scintillasjonstellersen oppgir svaret i antall lysglimt per minutt (cpm). Denne verdien normaliseres mot mengde protein i cellelysatsen per brønn, for å korrigere for variasjoner i antall celler per brønn. Den resulterende verdien normaliseres deretter mot total mengde radioaktivitet (cpm) i de aktuelle trappemediene per brønn. Følgende formler ble benyttet i utregningen;

1) Rådata normaliseres mot proteinmengde:

For CA-målingene må proteinverdiene multipliseres med 4, før de settes inn i ligning 1.

$$\frac{\text{Rådata (cpm)}}{\text{protein } (\mu\text{g/ml})/5} * 1000$$

2) Beregning av total mengde radioaktivitet i akuttmediene:

$$\frac{\text{Gjennomsnittlig radioaktivitet i akuttmediet (cpm)} * 20}{100}$$

3) Normalisering mot total mengde radioaktivitet i akuttmediene:

$$\frac{\text{Ligning 1}}{\text{Ligning 2}}$$

Den resulterende verdien, i nmol/mg, sier derfor hvor mye av den totale mengden av [¹⁴C]-substratene som ble oksidert eller akkumulert.

Begrepet «fraksjonell oksidasjon» sier noe om hvor stor andelen av det radioaktive substratet som har blitt oksidert (CO₂) i forhold til det som ble tatt opp i cellene (CO₂ + CA), og beregnes fra de normaliserte verdiene etter følgende formel:

4) Fraksjonell oksidasjon:

$$\frac{CO_2}{(CO_2 + CA)}$$

2.4.1 Radioaktive isotoper

Følgende radioaktive isotoper ble benyttet i denne oppgaven:

- [1-¹⁴C]OA (0,5 µCi/ml)
- D-[¹⁴C(U)]glukose (0,6 µCi/ml)

Benyttede akuttmedier er gitt i appendiks 5.1. – 5.7.

2.4.2 Utsåing og behandling av myotuber

Satellittceller ble sådd ut på 96-brønners brett coated med 2 % matrigel med 10 000 celler per brønn (avsnitt 2.3.1 og 2.3.2), og proliferert og differensiert til myotuber (avsnitt 2.3.3). På dag 2 etter differensieringsstart ble eventuelle agonister tilsatt og forsøk ble utført på dag 4.

2.4.3 Trapping

En 96-brønners filterplate (Unifilter®-96 GF/B®) tildekt med et filter, ble fuktet med 20 µl 1 M NaOH per filterbrønn. Eventuelle overskudd av NaOH ble fjernet ved å invertere filterplaten. Differensieringsmediet på cellebrettet ble erstattet med 50 µl akuttmedium (appendiks 5.1. – 5.7.) per brønn. Trappeoppsettet ble satt sammen som beskrevet tidligere (avsnitt 2.4), og inkubert ved 37 °C i 4 timer.

2.4.4 Måling av substratoksidasjon

Etter inkuberingen ble trappeoppsettet demontert og filterplaten tatt ut. Hver filterbrønn på filterplaten ble tilsatt 40 µl scintillasjonsvæske, Optiphase Supermix®, før filterplaten ble dekt til med en gjennomsiktig, selvklebende plastfilm (TopSeal®-A) og satt til inkubasjon ved romtemperatur i 2 dager. Radioaktiviteten som var fanget opp av filterplaten ble målt ved hjelp av β-scintillasjonstelleren, 1450 Microbeta Plus® fra Wallac.

2.4.5 Høsting til måling av celleassosierte substrater og protein

Etter inkuberingen ble trappeoppsettet demontert og cellebrettet tatt ut. Trappemediet ble fjernet og cellebrettet ble vasket 2 ganger med 150 µl 1x høstebuffer (appendiks 4.2.) per brønn, for å fjerne rester av det radioaktive akuttmediet. For å lysere cellene ble 200 µl 0,1 M NaOH tilsatt per brønn, før cellebrettet ble fryst ved -20 °C over natt.

2.4.6 Måling av celleassosiert substrat (CA)

Frosne cellebrett ble tint i romtemperatur i omtrent 2 timer, før cellene ble homogenisert ved kraftig røring og pipettering. 50 µl av dette lysatet ble deretter overført til hver brønn i en 96-brønners Isoplate® og 50 µl av de benyttede akuttmediene ble tilsatt i én av de tomme brønnrekkene med 2-4 paralleller. Etter tilsetning av 100 µl Optiphase Supermix® til hver brønn ble isoplaten dekt til av en gjennomsiktig plastfilm (TopSeal®-A) og inkubert ved romtemperatur i minst 2 timer. Radioaktiviteten ble målt ved hjelp av β-scintillasjonstelleren, 1450 Microbeta Plus® fra Wallac.

2.4.7 Måling av proteinmengde

For å kvantifisere total mengde protein ved substratoksidasjonsmetoden ble en metode utviklet av Bradford benyttet [85]. Prinsippet bak Bradford-metoden er at fargestoffet "Coomassie Brilliant Blue G-250" vil ved binding til proteiner undergå en fargeendring, og dermed få endret sitt absorpsjonsmaksimum. «Coomassie Brilliant Blue G-250» vil ved binding til proteiner endres fra rødt til blått, og absorpsjonsmaksimumet vil endres fra 465 nm til 595 nm [85]. Det er denne økningen i absorpsjon ved 595 nm som måles og gir et kvantitativt uttrykk. Tilsetning av standardløsninger av proteiner i kjente konsentrasjoner muliggjør dannelse av en standardkurve, siden absorbansen er direkte proporsjonal med mengden protein til stede, og fra denne standardkurven kan derfor den totale mengden protein i en ukjent prøve estimeres.

Etter homogenisering av cellene (avsnitt 2.4.5), ble 50 µl av lysatet overført til hver brønn i en 96-brønners plate med flat bunn fra NUNC. Standardløsninger av proteiner (0, 10, 20, 40, 80, 160 µg/ml bovint serumalbumin (BSA) fortynnet i 0,1 M NaOH) ble tilsatt i to paralleller. «Bio-Rad Assay Protein reagent Concentrate», inneholdende «Coomassie Brilliant Blue G-250», ble fortynnet 1:5 i destillert vann (dH₂O), før 200 µl av denne løsningen ble tilsatt per brønn. Etter inkubering i 5 minutter ved romtemperatur ble platen målt med Wallac VictorTM mikroplateleser, fra Perkin Elmer, ved bølgelengde 595 nm.

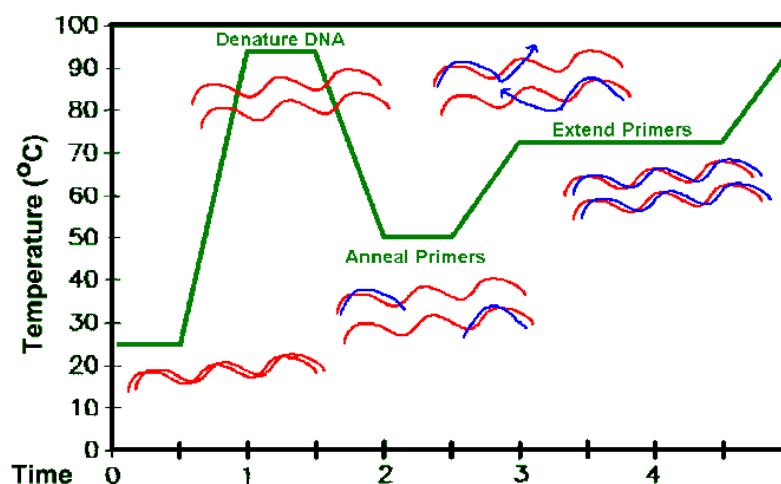
2.5 Real-time RT-PCR

I denne oppgaven ble real-time revers-transkriptase-polymerase-kjedereaksjon (real-time RT-PCR) benyttet til å studere eventuelle forskjeller i ekspresjonen av et utvalg gener mellom NCU-G1-knockout- og villtype-mus, og effekter av PPAR-agonister på genekspressjonen.

Polymerase-kjedereaksjon, PCR, er en metode for å enzymatisk syntetisere DNA. Ved hjelp av denne metoden kan selv kun én enkelt kopi av et DNA-fragment amplifiseres, i en syklisk prosess til flere millioner kopier, som da muliggjør kvantifisering av det aktuelle DNA-fragmentet [86, 87]. For å kunne studere uttrykket av et gen, benyttes mengden messenger RNA (mRNA) transkribert fra det aktuelle genet som et mål på genekspressjonen [87]. Siden real-time RT-PCR-systemet benytter DNA-polymerase, som kun kan benytte dobbelttrådet DNA som templat, må mRNA først revers-transkriberes. Dette gjøres ved hjelp av enzymet

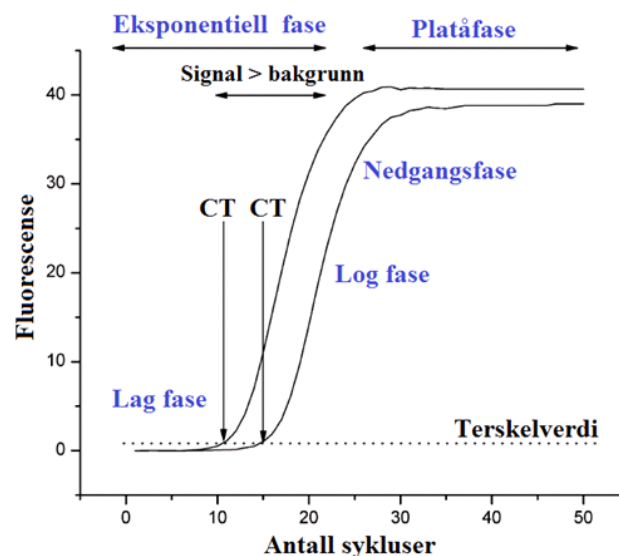
revers transkriptase slik at det blir dannet dobbeltrådet komplementært DNA (cDNA), som kan benyttes som PCR-templat [88].

I real-time RT-PCR vil cDNA undergå en tretrinnsreaksjon (figur 2.4); i det første trinnet vil den høye temperaturen (94 °C) resultere i en denaturering av cDNA, hvor trådene i cDNA separeres og det blir dannet enkelttrådet DNA (ssDNA). Når temperaturen senkes til 60 °C vil reaksjonen gå inn i en annealingsfase, hvor to primere vil gjenkjenne og hybridisere til sine komplementære seter på hvert sitt ssDNA. Primerene er designet slik at «forward primer» vil bindes til ssDNA ved start av ønsket gensekvens og «reverse primer» vil bindes til slutten av ønsket gensekvens, i tillegg til at deres frie 3'-ender vender mot hverandre slik at transkripsjon av begge trådene kan skje samtidig. Deretter vil en temperaturøkning til 72 °C starte elongeringsfasen, hvor *Thermus aquaticus* (Taq)-DNA-polymerase aktiveres og bindes til 3'-endene på primerene, og DNA syntetiseres fra de tilsatte deoksyribonukleosidtrifosfatene (dNTP), slik at det blir dannet dsDNA [89]. Taq-DNA-polymerase er hentet fra en termofil bakterie, og denne benyttes da den er stabil ved høyere temperaturer og vil ikke denatureres i det første trinnet i PCR-reaksjonen [29, 89]. For hver PCR-syklus vil det ideelt foreligge en fordobling av antallet kopier av utgangstemplatet, som vil gi opphav til et kvantitativt forhold mellom de nydannede PCR-produktene og utgangstemplatene ved start [87].



Figur 2.4: Real-time revers-transkriptase-polymerase-kjedereaksjon (Real-time RT-PCR). Ved første oppvarming denatureres komplementært DNA (cDNA) til enkelttrådet DNA (ssDNA). En påfølgende avkjøling fører til annealing av primere til ssDNA, før en ny temperaturøkning resulterer i aktivering av Taq-DNA-polymerase, som da vil syntetisere DNA [90].

Selve PCR-prosedyren består av 4 ulike kinetiske faser (figur 2.5). I den første fasen, lag fasen, foregår det en eksponentiell amplifikasjon av PCR-produktene, men det er ikke før i den neste fasen, log fasen, at den eksponentielle amplifikasjonen medfører en fordobling av PCR-produktene for hver syklus [91]. Det er i denne lineære fasen at det foreligger et kvantitativt forhold mellom de nydannede PCR-produktene og mengden utgangstemplat. PCR-reaksjonen vil etter en viss tid avta eksponentielt og gå inn i en nedgangsfase, på grunn av blant annet hemmere av PCR-reaksjonen i templatet, forbruk av reagenser eller akkumulering av pyrofosfatmolekyler. Denne fasen vil til slutt resultere i den såkalte platåfasen, hvor ingen PCR-produkter dannes [86, 91]. Dette medfører at en såkalt endepunktkvantifisering, hvor man måler mengden PCR-produkt ved enden av prosedyren, ikke vil gi pålitelige resultater. Derimot, ved real-time PCR vil mengden PCR-produkt som akkumuleres per syklus måles kontinuerlig [86, 91].



Figur 2.5: Kinetiske faser i PCR-prosedyren. Den første fasen er lag fasen, hvor det foreligger en eksponentiell amplifikasjon, der det fluorescerende signalet har ikke krysset deteksjonsgrensen. I log fasen foreligger det også en eksponentiell amplifikasjon, men det fluorescerende signalet har krysset deteksjonsgrensen og det foreligger en fordobling av PCR-produktene per syklus. Det antall sykluser som trengs for å krysse deteksjonsgrensen kalles terskelverdi (CT). Reaksjonen vil etter hvert avta og gå inn i nedgangsfasen, som til slutt resulterer i platåfasen, hvor ingen PCR-produkter blir dannet. Modifisert fra [87, 91].

For å kunne måle kontinuerlig under PCR-prosedyren benyttes ulike deteksjonsmetoder som baseres på at det dannes et fluorescerende signal som er direkte proporsjonal med mengden PCR-produkt dannet [87, 92]. I denne oppgaven ble SYBR® Green 1 benyttet, som vil

fluorescere når det bindes til dsDNA, og intensiteten på fluorescensen er derfor avhengig av mengden cDNA dannet [86]. SYBR® Green 1 har en ulempe ved at den er uspesifikk, den vil binde seg til alle dsDNA dannet under PCR-reaksjonen, dvs. både uspesifikke PCR-produkter og primer-dimerer [86]. For å redusere betydningen av denne uspesifisiteten ble det i denne masteroppgaven laget smeltekurver ved hjelp av LightCycler® 480, hvor fluorescensen ved økende temperatur kartlegges. Når smeltepunktet (T_m) nås, vil dsDNA dissosiere til ssDNA og det fluorescerende stoffet frisettes og føre til en rask nedgang i fluorescens. På denne måten kan smeltepunktet (T_m) til den ønskede dsDNA-kopien skilles fra andre PCR-produkter eller primerdimere, som vil smelte ved lavere temperaturer og ha bredere topper [86, 92].

Mengden utgangstemplat benyttes som et mål på uttrykket av det aktuelle målgenet. For å estimere mengden utgangstemplat benyttes antall sykluser som trengs for at fluorescensen skal gå over en gitt deteksjonsgrense (figur 2.5). Antall sykluser som er nødvendig for å krysse denne deteksjonsgrensen kalles terskelverdi (CT). CT-verdien er invers relatert til mengden utgangstemplat [86, 92]. For å kvantifisere mengden utgangstemplat i den ukjente prøven ble det i denne oppgaven benyttet relativ kvantifisering, hvor mengden av målgenet i prøven normaliseres mot et husholdningsgen og relateres til en tilsvarende normalisert kontroll [86]. Husholdningsgener er gener som teoretisk uttrykkes relativt konstant under ulike eksperimentelle forhold. Ved at slike gener amplifiseres sammen med målgenet under PCR-prosedyren, vil de kunne fungere som en intern kontroll ved at de korrigerer for variasjon mellom prøvene og reduserer feil som kan skje ved forskjeller i startmengde av RNA, RNA-kvalitet eller forskjeller i effektiviteten i cDNA-syntesen og PCR-amplifikasjonen [86]. I denne masteroppgaven ble β -aktin og «hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase» (HPRT) benyttet som husholdningsgener til normalisering [92].

For å gjøre en gyldig sammenligning av de ulike behandlingene ble det i denne oppgaven også benyttet en metode som tar høyde for effektiviteten til de benyttede primerparene. Ideelt er primereffektiviteten (E) lik 2, men siden effektiviteten kan variere mellom ulike primerpar, vil en estimering av primereffektiviteten gi mer nøyaktige resultater. En forutsetning for å benytte denne metoden til relativ kvantifisering er at de samme primerparene ble benyttet for alle behandlingene [93]. For å finne primereffektiviteten ble det laget en standardkurve fra fortynninger av cDNA, hvor logaritmen til fortynningsgraden ble plottet mot CT-verdien til de enkelte fortynningene. Stigningstallet til de aktuelle standardkurvene gir informasjon om

effektiviteten til primerparene. For å oppnå nøyaktige og reproducerbare resultater bør effektiviteten ligge nær 100 %, som innebærer en fordobling av templatet etter hver syklus under den eksponentielle amplifikasjonsfasen, og dette tilsvarer et stigningstall (Δ) på -3,32 [92]. Primereffektiviteten kan beregnes etter følgende formel;

$$5) E = 10^{-1/\Delta} - 1$$

Formler for relativ kvantifisering er vist i appendiks 8, og de resulterende ratioene for normalisert relativ andel (NRQ) for henholdsvis test mot kontroll, vil vise hvor stor den relative forskjellen i genekspresjon er mellom gruppene.

2.5.1 Høsting av celler og isolering av total RNA

Satellittceller ble sådd ut på 25 cm² celleflasker coated med 2 % matrigel med 600 000 celler per flaske (avsnitt 2.3.1 og 2.3.2), og proliferert og differensiert til myotuber (avsnitt 2.3.3). På dag 2 etter differensieringsstart ble agonister tilsatt til en konsentrasjon på 10⁻⁷ M. Myotubene ble høstet på dag 4, hvor mediet ble fjernet og cellene vasket 2 ganger med 2 ml «Dulbecco's Phosphate Buffered Salin» (DPBS) uten Ca²⁺ og Mg²⁺. Etter at siste rest av DPBS var fjernet ble 600 µl lysisbuffer fra Agilent Technologies tilsatt.

Isolering av RNA ble utført ved hjelp av kittet «Agilent Total RNA Isolation Mini Kit» og i henhold til protokollen «Agilent Total RNA Isolation Protocol for Cultured Cells» fra Agilent Technologies. Cellelysate ble overført til en mini-prefiltreringskolonne og sentrifugert ved 16 000 x g i 3 minutter for å homogenisere cellene og fjerne cellulære kontaminanter. Filtratet med RNA, ble tilsatt et tilsvarende volum 70 % etanol og blandet til en homogen løsning, før løsningen ble inkubert ved romtemperatur i 5 minutter. Løsningen ble deretter overført til en mini-isolasjonskolonne og sentrifugert i 30 sekunder ved 16 000 x g, hvor RNA ble bundet til isolasjonskolonnen. Isolasjonskolonnen ble vasket to ganger ved å tilsette 500 µl vaskeløsning og sentrifugere i 30 sekunder ved 16 000 x g, før kolonnen ble sentrifugert i 2 minutter ved 16 000 g for å fjerne eventuelle rester av vaskeløsningen. For å eluere ut totalt RNA fra isolasjonskolonnen ble 15 µl nukleasefritt vann tilsatt og kolonnen sentrifugert i 2 minutter ved 16 000 x g. For å sikre at mest mulig RNA ble eluert ble dette trinnet utført to ganger. Isolert RNA ble oppbevart ved -70 °C frem til bruk.

2.5.2 Kvantifisering av RNA

Ved å benytte spektrofotometri kan absorbansen ved ulike bølgelengder benyttes til å bestemme konsentrasjonen av RNA i prøven og prøvens renhet [92, 94]. Siden RNA absorberer lys med et absorpsjonsmaksimum ved bølgelengde 260 nm, mens proteiner har absorpsjonsmaksimum ved 280 nm, kan ratioen mellom absorbansen ved 260 og 280 nm benyttes til å vurdere RNA-prøvens renhet. Ratioen bør ligge mellom 1,8 og 2, og en ratio under 1,8 kan tyde på proteinkontaminasjon, som kan senke reaksjonseffektiviteten [92, 94]. Tilsvarende kan ratioen mellom absorbansen ved 260 og 230 nm kan brukes til å vurdere kontaminasjon av blant annet stoffer som inneholder peptidbindinger eller fenolringer, som vil hemme enzymatiske reaksjoner [92, 94].

I denne oppgaven ble Nanodrop 2000 fra Thermo Scientific benyttet til å kvantifisere mengden RNA i de aktuelle prøvene og undersøke prøvenes renhet. For hver måling ble det benyttet 2 µl av den aktuelle prøven.

2.5.3 Syntese av cDNA

For å revers transkribere RNA til cDNA ble kittet «Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit» fra Roche Applied Science benyttet. Uttak av prøvene tilsvarende 5 µg totalt RNA ble overført til mini-eppendorfrør som ble holdt på is under hele prøveopparbeidelsen. Templat-Primer-miks (appendiks 6.1.) ble tilsatt, før prøvene ble plassert i GeneAMP PCR System 2400 fra Perkin Elmer, for å eliminere blant annet uspesifikke bindinger og primerdimere, ved 65 °C i 10 minutter. Deretter ble 7 µl Mastermiks (appendiks 6.2.) tilsatt før prøvene ble satt tilbake for cDNA-syntese under følgende betingelser [89];

- 25 °C i 10 minutter (templatpriming)
- 50 °C i 60 minutter (revers transkribering)
- 85 °C i 5 minutter (inaktivering av revers transkriptase)

Etter endt syntese ble rørene satt på is for å stoppe videre reaksjon, og nylaget cDNA ble fortynnet 1:5 i nukleasefritt vann.

2.5.4 Verifisering av primerkvalitet

Primertitrering

For alle genene som skulle studeres ved real-time RT-PCR ble kvaliteten til primerparene undersøkt ved hjelp av primertitrering. Til denne prosedyren ble kittet «LightCycler® 480 SYBR Green I Master» fra Roche Applied Science, benyttet. Til hvert gen ble det laget én primerspesifikk mastermiks (appendiks 6.3.), inneholdende både «forward» og «revers» primer, og det ble laget en fortynningsrekke av cDNA (1:1, 1:10, 1:100 og 1:1000 i nukleasefritt vann). 1 µl av fortynnet cDNA og 9 µl primerspesifikk mastermiks ble tilsatt per brønn i en LightCycler® 480 96-brønners plate i duplikater. For hvert primerpar ble det applisert én negativ kontroll (NTC), bestående av 9 µl mastermiks og 1 µl nukleasefritt vann. Platen ble deretter tildekt med en plastfilm (LightCycler® 480 Multiwell Sealing Foil) og etter en rask sentrifugering, ble platen satt inn i LightCycler® 480, fra Roche Applied Science, og det ble kjørt 45 sykluser med PCR-programmet vist i tabell 2.3. Primere benyttet i denne oppgaven er vist i tabell 2.4. Primereffektiviteten ble beregnet som nevnt tidligere (avsnitt 2.5).

Tabell 2.3: PCR-programmet benyttet i denne masteroppgaven.

PCR-programmet bestod av en kort preinkubering, etterfulgt av amplifisering i 45 sykluser. En smeltepunktsanalyse ble utført, før systemet ble nedkjølt.

Trinn	Temperatur (°C)	Tid (sekunder)
Preinkubering	95	300
Amplifisering (45 sykluser)	95	10
	60	10
	72	10
Smeltekurveanalyse	95	5
	65	60
	97	-
Nedkjøling	40	30

Tabell 2.4: Primere benyttet i denne masteroppgaven.

Oversikt over primere benyttet i denne masteroppgaven til å undersøke genekspressjon hos myotuber fra både mus og mennesker. F; «forward primer», R; «revers primer».

Primere til myotuber fra mus	
Gener	Primer
CD36	F: 5'-GGCCAAGCTATTGCGACAT-3' R: 5'-CAGATCCGAACACAGCGTAGA-3'
PDK 4	F: 5'-AAAGGACAGGATGGAAGGAATCA-3' R: 5'-TTTTCTCTGGGTTTGCACAT-3'
PPAR α	F: 5'-TCTTCACGATGCTGTCCTCCT-3' R: 5'-GGAACCTCGCCTGTGATAAAGC-3'
PPAR β	F: 5'-TCCAGAAGAAGAACCGCAACA-3' R: 5'-GGATAGCGTTGTGCGACATG-3'
PPAR γ	F: 5'-CAGGCCGAGAAGGAGAAGCT-3' R: 5'-GGCTCGCAGATCAGCAGACT-3'
SCD2	F: 5'-ACTGTGACTCAAGTTCAACTCTTGAAA-3' R: 5'-TGCCCACAAATTGAGGATAGC-3'
NCU-G1	F: 5'-GCTTCTCCTCGTGGAACCAT-3' R: 5'-CGGCAGGTGCATATTCATCA-3'
PGC1 α	F: 5'-ATTGTTTCGATGTGTCGCCTTC-3' R: 5'-TGAACGAGAGCGCATCCTTT-3'
SCD1	F: 5'-ATGTGGCTTTGGCTGATCCAT-3' R: 5'-ACTTGCCCATGTCTCTGGTGT-3'
Angptl4	F: 5'-CTGGGTGCCACCAATGTTTC-3' R: 5'-GTCCCCACGGAGGTCATG-3'
PLIN 2	F: 5'-CAGCCAACGTCCGAGATT G-3' R: 5'-CATGGTAGTCGTCACCACATCCT-3'
β -aktin	F: 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3' R: 5'-GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA-3'
Primere benyttet til humane myotuber	
Gener	Primere
NCU-G1	F: 5'-GCTTGAGTTTGACAGCACCA-3' R: 5'-TTGGCAAAAGTCCTGGTAGG-3'
HPRT1	F: 5'-GACCAGTCAACAGGGGACAT-3' R: 5'-CTTGCGACCTTGACCATCTT-3'

Agarose gelelektroforese

For å undersøke amplifikasjonsspesifisiteten til primerene, ble gelelektroforese benyttet til å visuelt kontrollere at kun de ønskede sekvensene ble amplifisert [51, 89]. Gelelektroforese er en metode for separasjon basert på mobiliteten til ladede molekyler i et elektrisk felt [89]. Prinsippet for metoden er negativt ladede DNA-fragmenter i et elektrisk felt vil vandre mot den positive elektroden. Fragmentenes vandring gjennom selve gelen bestemmes av deres lengde (antall basepar) og form, da større molekyler vil møte større motstand og vandre kortere gjennom porene i gelen. Dette fører til at DNA-fragmentene separeres, og ved å sammenligne med en DNA-molekylvektsstandard kan fragmentenes størrelse estimeres. For å lette prøveappliseringen og muliggjøre visuell kontroll på fragmentenes vandring gjennom gelen kan en fargeindikator tilsettes. Deteksjon av fragmentenes posisjon i gelen etter endt elektroforese ble i denne oppgaven utført ved å tilsette etidiumbromid under støping av gelen, som ved binding til DNA vil fluorescere under UV-lys med bølgelengde 260 – 300 nm [89]. Deteksjon av ett enkelt, pent avgrenset bånd med riktig størrelse, vil tyde på at primerenes amplifikasjonsspesifisitet er god [29, 89].

En 2 % agarose gel ble laget ved å løse «SeaKem® LE Agarose» i 1 x Tris-Acetate-etyldiamintetraeddiksyre (TAE)-buffer (appendiks 6.4.), etterfulgt av koking til en klar løsning. Etter en kort avkjøling ble Etidiumbromid tilsatt til en ønsket konsentrasjon på 6 µg/ml, før løsningen ble overført til en støpeform. For å lage brønner i gelen ble en kam satt ned i formen, før løsningen ble avkjølt til romtemperatur for å danne en fast gel. Da gelen hadde stivnet ble støpeformen satt over i et gelelektroforeseapparat, Kodak Biomax MP1015, og kammen ble fjernet. Gelen ble tildekt med 1 x TAE buffer, før 10 µl av en DNA-størrelsesstandard, «GeneRuler™ 100 Bp DNA Ladder» fra Fermentas, ble applisert på gelen. 4,5 µl 6 x «Loading Dye» fra Fermentas ble til satt prøveløsningen, før uttak på 10 µl av disse løsningene ble applisert på gelen. Gelen ble deretter underlagt en konstant elektrisk spenning på 100 volt i omtrent 1 time. Etter separasjonen ble bufferen fjernet, før gelen ble fotografert under UV-lys i UVitec Geldoc Gel Light Imaging System fra Tamro.

2.5.5 Kvantifisering ved hjelp av real-time RT-PCR

Til denne prosedyren ble kittet «LightCycler® 480 SYBR Green I Master» fra Roche Applied Science benyttet. Primere benyttet i denne masteroppgaven er vist i tabell 2.4 (avsnitt 2.5.4). For å oppnå et statistisk design som tilrettelegger for en korrekt sammenligning av

behandlingene og donorene, ble hvert forsøk utført med minst tre uavhengige biologiske replikater, det vil si minst 3 ulike donorer fra hver donorgruppe, med tre replikater av hver [93].

For hvert gen som skulle studeres, ble det laget én primerspesifikk mastermiks (appendiks 6.5.). 1 µl cDNA og 9 µl mastermiks ble tilsatt per brønn i en LightCycler® 480 96-brønners plate, i triplikater. For hvert primerpar ble det applisert én negativ kontroll (NTC), bestående av 9 µl mastermiks og 1 µl nukleasefritt vann. Platen ble deretter tildekt med en plastfilm (LightCycler® 480 Multiwell Sealing Foil) og etter en rask sentrifugering, ble platen satt inn i LightCycler® 480, fra Roche Applied Science, og det ble kjørt 45 sykluser med det samme PCR-programmet som vist tidligere (avsnitt 2.5.4, tabell 2.3.). Formler benyttet til relativ kvantifisering av resultatene er gitt i appendiks 8.

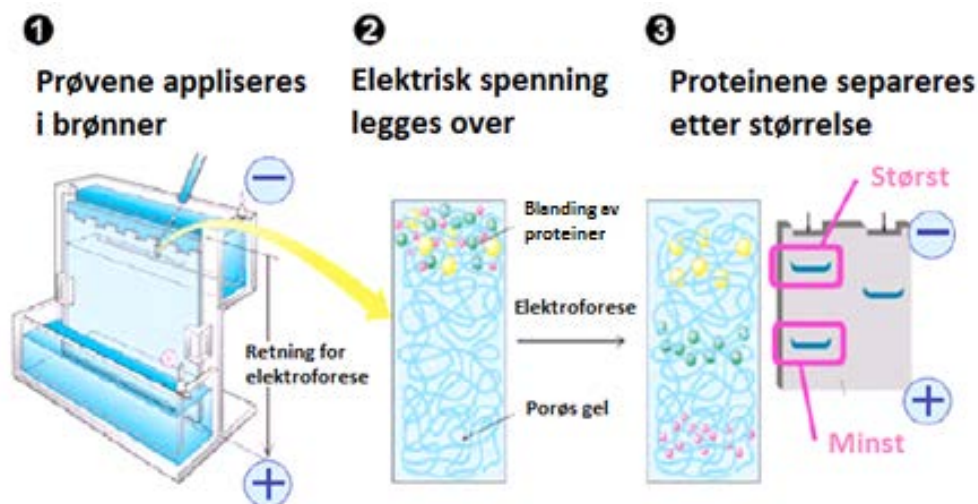
2.6 Westernblotting

Westernblotting, også kjent som immunoblotting, er en metode som benyttes for å identifisere og lokalisere proteiner basert på ulike antistoffers evne til å gjenkjenne og binde til spesifikke epitoper på proteinene [95]. For å kunne utføre denne metoden må proteinene i prøvene først separeres, og i denne masteroppgaven ble dette utført ved hjelp natriumdodekylsulfat (SDS) polyakrylamid-gelelektroforese (PAGE), som er en metode for separasjon basert på mobiliteten til ladede molekyler i et elektrisk felt [96].

Ulike proteiner kan ha ulik ladning, tredimensjonal struktur og molekylvekt. Proteiner som er ulikt foldet kan ta opp ulike volumer og vandre med ulik hastighet gjennom en separasjonsgel, mens proteiner med ulik ladning vil kunne vandre med både ulik hastighet og i ulike retninger i et elektrisk felt. For å kunne separere proteiner ved hjelp av gelelektroforese kun basert på deres størrelse, må proteinene denatureres og eventuelle ladninger maskeres [96, 97]. For å oppnå dette under prøveopparbeidelsen tilsettes SDS, før prøvene kokes. Dette fører til at proteinene får negative ladninger, ved at negativt ladede miceller pakkes rundt proteinene og maskerer eventuelle ladninger, i tillegg til at proteinene denatureres og foldes ut. Tilsetning av β-merkaptøetanol sørger for at disulfidbindinger brytes, slik at proteinenes flerdimensjonale struktur elimineres. For å lette prøveappliseringen tilsettes glyserol, som sørger for at tettheten til prøvene øker, slik at prøvene synker lettere til bunnen av brønnene.

Til slutt tilsettes fargeindikatoren bromfenolblått, for å muliggjøre visuell kontroll av prøvenes migrasjon under selve elektroforesen [96].

SDS-PAGE består av en polyakrylamidgel som inneholder SDS, som holder proteinene i en denaturert tilstand [89]. Når en spenning legges over gelen vil proteinene i de appliserte prøvene vil vandre mot den positive elektroden med en hastighet kun bestemt av deres størrelse (figur 2.6). Ved endt separasjon kan proteinene detekteres som bånd ved ulike posisjoner i gelen [96]. Størrelsen på porene i gelen er avgjørende for proteinenes vandring gjennom gelen, hvorav store proteiner vil møte større motstand enn mindre proteiner, og vil derfor vandre med en lavere hastighet gjennom gelen. Porestørrelsen bestemmes av konsentrasjonen av akrylamid, hvor en høyere konsentrasjon medfører mindre porer. Det finnes ulike typer geler, blant annet «stacking»-gel, hvor en lav porestørrelse vil føre til at proteinene oppkonsentreres, som ofte er ønskelig før selve separasjonen utføres på en separasjonsgel. Gradient geler derimot, har en avtagende porestørrelse mot anoden, slik at prøver med proteiner med et bredt spekter av ulike molekylvekter kan separeres på samme gel [96]. Under appliseringen av prøvene på gelen, appliseres også en molekylvektstandard, som består av ulike proteiner med kjent molekylvekt. Avstanden disse proteinene vandrer gjennom gelen vil gi opphav til en logaritmisk skala, fra hvor størrelsen til proteinene i prøvene kan estimeres [96].



Figur 2.6: Skisse over forløpet i SDS-PAGE. Prøvene appliseres i brønnene på gelen (1) og en elektrisk spenning legges over (2). Proteinene i prøvene vil da vandre mot den positive elektroden med en hastighet bestemt av deres størrelse, og dette fører til at proteiner med ulike størrelse separeres (3). Modifisert fra [98].

Etter fullført separasjon overføres proteinene fra gelen til en membran, som enten kan bestå av nitrocellulose eller polyvinylidfluorid (PVDF). Det finnes flere prosedyrer for å overføre proteinene til den aktuelle membranen, hvorav våt blotting og halvtørr blotting er de vanligste. Prinsippene for halvtørr blotting, som benyttet i denne oppgaven, er at gelen legges i direkte kontakt med membranen (figur 2.7). Et fuktet filterpapir legges over, og det resulterende blotteoppsettet omslutes av to plater, som utgjør den positive (anoden) og den negative (katoden) elektroden. Deretter legges det en spenning over systemet, slik at strømmen går fra gelen til membranen. Proteinene i gelen vil da vandre mot anoden, og bindes opp på membranen i samme mønster som på gelen [96].

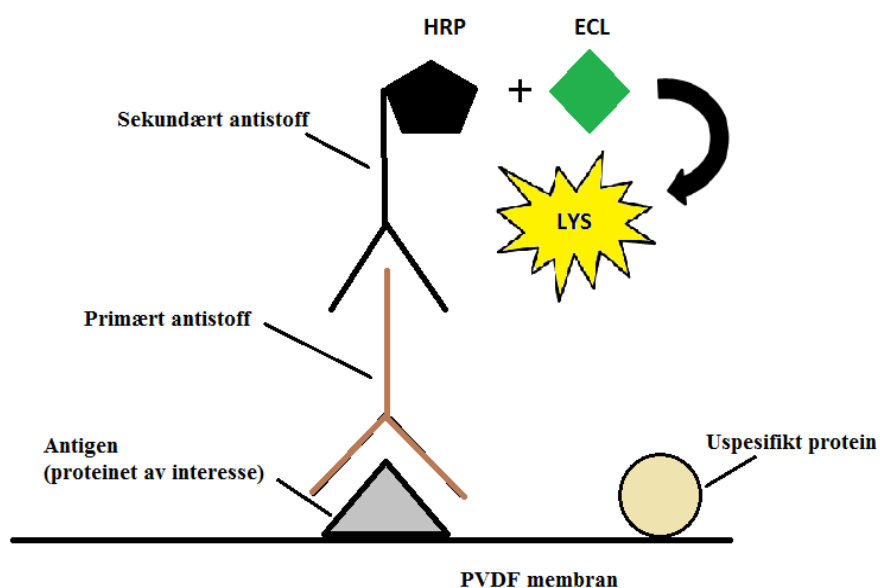


Figur 2.7.: Skisse over oppsett for halvtørr blotting. Membranen ligger på en plate som utgjør anoden, og gelen legges direkte på denne membranen. Over legges et fuktet filterpapir og katodeplaten, før en svamp legges over. Når det legges en spenning over systemet vil proteinene, på grunn av sin negative ladning, vandre mot anoden og dermed fanges opp av membranen. Modifisert fra [96].

Når alle proteinene har blitt overført til membranen kan proteinet av interesse detekteres og lokaliseres (figur 2.8). Til å lokalisere det aktuelle proteinet benyttes spesifikke antistoffer som gjenkjenner og binder til spesifikke epitoper på proteinet [95, 96]. Antistoffer kan deles inn i monoklonale og polyklonale, hvorav de monoklonale antistoffene kun bindes til én enkelt epitop, som vil gi en høy spesifisitet, men en lavere sensitivitet. Polyklonale antistoffer består av en blanding med ulik spesifisitet til flere epitoper og gir dermed en høy sensitivitet, men en lavere spesifisitet [96]. Før det aktuelle antistoffet kan tilføres må membranen først blokkeres for uspesifikk binding av antistoffet til uokkuperte seter på membranen. Dette kan utføres ved å tilføre proteiner, som vil bindes til de uokkuperte setene, eller ved å benytte ikke-ioniske detergenter, som hindre binding av proteiner til de uokkuperte setene [96]. Etter blokkingen kan membranen inkuberes med det primære antistoffet. Før det sekundære antistoffet kan tilsettes, må overskudd av det primære antistoffet først fjernes, slik at det

sekundære antistoffet kun vil gjenkjenne og binde seg til de primære antistoffene som er bundet til proteinene på membranen [96].

Det sekundære antistoffet er konjugert til enzymet pepperrotperoksidase (HRP), som muliggjør deteksjon av protein-antistoff-antistoff-komplekset ved hjelp av kjemoluminescens [95, 96]. Prinsippet for kjemoluminescens er at membranen inkuberes med et luminolsubstrat, som i nærvær av peroksid, vil bli oksidert av HRP og dette fører da til frisetelse av lys. I nærvær av visse kjemikalier kan denne lysintensiteten forsterkes kraftig, og dette prinsippet har gitt opphav til forsterket kjemoluminescens (ECL). Lysintensiteten bestemmes av antallet reagerende enzymer og er derfor proporsjonal til mengden antistoff, som igjen er relatert til mengden protein på blottet. Dette lyset kan detekteres ved å ta bilder ved hjelp av et digitalt fotokamera. Westernblotting kan gi informasjon om størrelsen til de aktuelle proteinene, ved å sammenligne med en proteinstandard i kDa, eller uttrykket av de aktuelle proteinene, ved å sammenligne med en ubehandlet prøve [95-97].



Figur 2.8: Skjematisk fremstilling av prinsippet for Westernblotting. Det primære antistoffet vil bindes til antigenet på det aktuelle proteinet, og et sekundært antistoff vil gjenkjenne og binde til det primære antistoffet. Det sekundære antistoffet er konjugert med pepperrotperoksidase (HRP), som vil reagere med forsterket kjemoluminescens (ECL)-reagens og resultere i frisetelse av lys. Modifisert fra [97].

I noen tilfeller er det nødvendig å detektere mer enn ett protein på samme membran, og i de tilfellene må membranen strippes, det vil si fjerne antistoffene, før nye antistoffer kan tilføres. Denne prosedyren er særlig viktig ved utførelse av kvantitative analyser, ved at det er mulig å

kontrollere at lik mengde total protein ble applisert i hver brønn. Dette oppnås ved å detektere mengden av et referanseprotein på den samme membranen [96].

2.6.1 Høsting av celler

Satellittceller ble sådd ut på 25 cm² celleflasker coated med 2 % matrigel med 600 000 celler per flaske (avsnitt 2.3.1 og 2.3.2), og proliferert og differensiert til myotuber (avsnitt 2.3.3). På dag 2 etter differensieringsstart ble agonister tilsatt til en konsentrasjon på 10⁻⁷ M. Myotubene ble høstet på dag 4, hvor mediet ble fjernet og cellene vasket 2 ganger med 2 ml 1 x høstebuffer (appendiks 4.2.). Etter at siste rest av høstebufferen var fjernet ble 150 µl 2x Samplebuffer (appendiks 7.1.) tilsatt, før cellene ble skrapet løs fra bunnen ved hjelp av en celleskrape. Derfra ble cellene overført til eppendorfrør og kokt i 5 minutter på varmeblokk ved 100 °C. 20 µl av ble tatt ut til proteinmåling, før 10 % β-merkaptoetanol og 5 % bromfenylblått ble tilsatt og prøvene kokt i ytterligere 5 minutter. Til slutt ble prøvene fryst ved -20 °C.

2.6.2 Måling av proteinmengde

For å kunne sammenligne proteinmengden i prøver som er kjørt på samme gel eller på ulike geler, er det viktig at den totale proteinkonsentrasjonen i hver brønn er lik mellom alle brønnene [96]. Prinsippet for denne metoden baseres på at proteiner i basisk miljø vil redusere kobber, Cu²⁺ til Cu¹⁺, og dette vil sammen med to molekyler «Bicinchoninic acid» (BCA) føre til dannelse av et farget kompleks som absorberer lys ved 540 – 590 nm.

I denne metoden ble proteinkonsentrasjonen målt ved hjelp av kittet «Pierce® BCA Protein Assay Kit» fra Thermo Scientific. «Pierce® BCA Protein Assay Reagent» ble laget ved å fortynne reagens B 1:50 i reagens A. Uttak på 5 µl av hver prøve ble fortynnet 1:7 i dH₂O og tilsatt 0,7 ml av «Pierce® BCA Protein Assay Reagent». En standardkurve ble laget ved å fortynne en løsning av 2 mg/ml bovint serumalbumin (BSA) i samplebuffer med dH₂O til følgende konsentrasjoner; 0, 5, 10, 20, 40, 80, 120 og 160 µg/ml. Fra hver standardløsning ble 35 µl tatt ut og blandet med 0,7 ml av «Pierce® BCA Protein Assay Reagent». Deretter ble prøveløsningene og standardløsningene satt på vannbad ved 60 °C i 30 minutter, etterfulgt av en kort avkjøling. 300 µl av hver prøve og hver standard ble tilsatt per brønn på en mikrotitrerplate, med 2 paralleller av hver, før absorbansen ved 590 nm ble målt ved hjelp av Wallac Victor™ mikroplateleser fra Perkin Elmer.

2.6.3 SDS-PAGE

Til denne prosedyren ble en ferdigstøpt gel, «NuPAGE Bis-Tris Mini gel», fra Life Technologies, benyttet. Denne gelen har en innebygd gradient, med en konsentrasjon av polyakrylamid som går fra 4 % til 12 %. Gelen ble lagt i elektroforesekaret, før karet ble fylt opp med en 1x «NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer» fra Life Technologies. Uttak av prøvene tilsvarende 15 µg protein ble tilsatt MQ-vann til et totalvolum på 20 µl. Prøvene ble blandet og sentrifugert, før de ble satt på vannbad ved 90 °C i omtrent 10 minutter. Etter 2 minutter på is og en kort sentrifugering, ble prøvene applisert på gelen ved hjelp av en Hamilton-sprøyte. En molekylvektstandard, «PageRuler™ prestained proteinladder» fra Thermo Scientific, ble applisert. Gelelektroforesen ble kjørt med en konstant spenning på 200 volt (V), og en varierende strømstyrke (70 - 120 mA/gel) i omtrent 50 minutter.

2.6.4 Westernblotting

Etter endt separasjon ble gelen tatt ut av plastholderne og overflødig polyakrylamid ble kuttet vekk, før gelen raskt ble lagt i et kar med MQ-vann, for å hindre uttørking. For å overføre proteinene fra gelen til en PVDF-membran ble «iBlot® 7-Minute Blotting System», fra Life Technologies. «iBlot™ Anode Stack», bestående av anoden og PVDF-membranen, ble lagt inn i maskinen, før gelen ble overført til membranen. Deretter ble et filterpapir fuktet i MQ-vann lagt over, før «iBlot™ Cathode Stack», bestående av katoden ble plassert over. Til slutt ble en svamp lagt øverst. Mellom hvert ledd i blotteoppsettet ble en rulle fuktet i MQ-vann benyttet til å fjerne luftbobler. Blottingen ble utført med 20 volt i 7 minutter.

2.6.5 Deteksjon av målproteiner

Etter endt blotting ble membranen trimmet og overført til et kar med 1x Tris-bufret saltløsning med 0,1 % Tween (TBST) (appendiks 7.2.). TBST ble fjernet før membranen ble blokket med 10 ml Blokkebuffer (appendiks 7.3.) i romtemperatur med jevnlig røring i omtrent 1 time. Etter fjerning av blokkebufferen ble 10 ml av det primære antistoffet (tabell 2.5), fortynnet som angitt av de aktuelle produsentene i blokkebuffer, tilsatt membranen og inkubert ved romtemperatur i 1-2 timer med jevnlig røring. For å fjerne overflødig antistoff etter inkuberingen, ble membranen vasket med 50 ml ren TBST i 5 minutter med kraftig røring, totalt fire ganger. Det sekundære antistoffet (tabell 2.5) ble fortynnet 1:4000 i blokkebuffer, før 10 ml av denne fortynningen ble overført til membranen og inkubert i

romtemperatur i 1-2 timer med jevnlig røring. Deretter ble membranen igjen vasket med 50 ml ren TBST i 5 minutter med kraftig røring, totalt fire ganger.

Tabell 2.5: Primære- og sekundære antistoffer benyttet i denne masteroppgaven.

For å detektere og kvantifisere målproteinet Angptl4 ble å-aktin benyttet som referanseprotein, og følgende antistoffer ble benyttet.

Mål-protein	Primært antistoff	Fortynning	Sekundært antistoff	Fortynning
Angptl4	Anti-ANGPTL4 polyklonal antistoff	1:250	HPR-geit Anti-Kanin IgG	1:4000
�-aktin	�-aktin polyklonal antistoff	1:500	HPR-geit Anti-Kanin IgG	1:4000

2.6.6 Visualisering og kvantifisering

For å visualisere b ndene ble «ECL Plus Western Blot Detection System» fra GE Healthcare benyttet. ECL-reagens ble laget ved å fortynne reagens B 1:40 i reagens A. Membranen ble inkubert i 5 minutter med 1 ml ECL-reagens. B ndene ble visualisert og kvantifisert, ved å måle optisk tetthet, ved hjelp av Kodak Image Station 4000r Pro fra Fisher Scientific.

2.6.7 Stripping av PVDF-membran

Etter endt visualisering ble membranen vasket med 50 ml dH₂O i 30 sekunder, før membranen ble inkubert i 5 minutter med 20 ml 0,2 M NaOH med jevnlig røring. Til slutt ble membranen vasket med 50 ml TBST i 1 minutt med jevnlig røring, og var deretter klar for inkubering med nye antistoffer (avsnitt 2.6.5).

2.7 Statistiske analyser

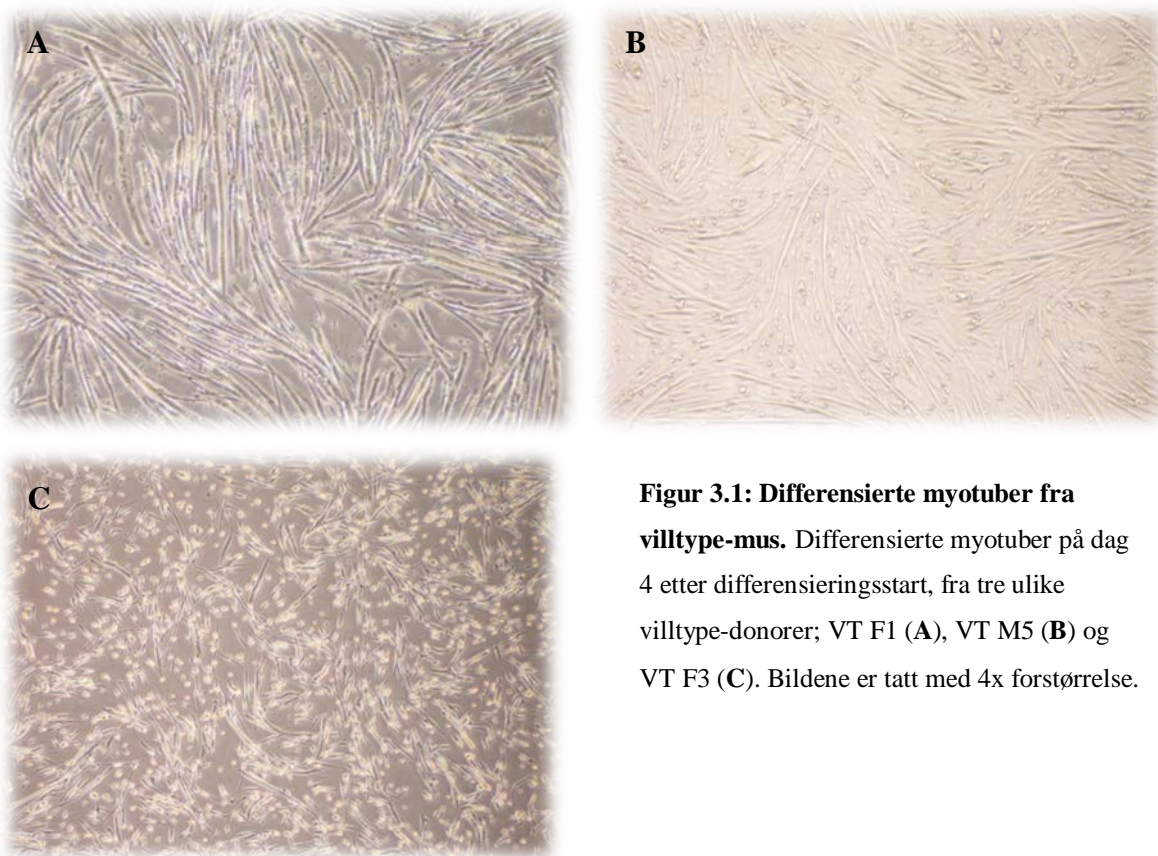
Alle data i denne masteroppgaven er, dersom ikke annet er oppgitt, illustrert som gjennomsnittet for hver donorgruppe \pm standardfeilen til gjennomsnittet (SEM). Hvert forsøksoppsett er utført med minst 1 forsøk fra samtlige donorer benyttet i denne oppgaven. For substratoksidasjonsmetoden varierer antall forsøk (n) fra 2-18 og hvert forsøk ble utført med enten 8 eller 12 paralleller. For Westernblotting ble 3 forsøk utført, mens for real-time RT-PCR ble 3 forsøk utført med 3 paralleller per forsøk. For å undersøke ulikheter mellom donorgruppene med hensyn på doseresponskurvene av GW 7647 og GW 501516, ble dataprogrammet SPSS benyttet til å utføre analyser ved hjelp av «Mixed model». For resterende statistiske analyser ble dataprogrammet GraphPad Prism 5 for Windows benyttet. For å undersøke effekten av tilsetning av GW 7647 og GW 501516 mot ubehandlet kontroll ble en parret t-test benyttet. For resten av oppgaven ble en tosidig Student's t-test benyttet. Gjennom hele oppgaven ble et signifikansnivå (α) på 0,05 benyttet.

3 Resultater

3.1 Donorkarakteristika

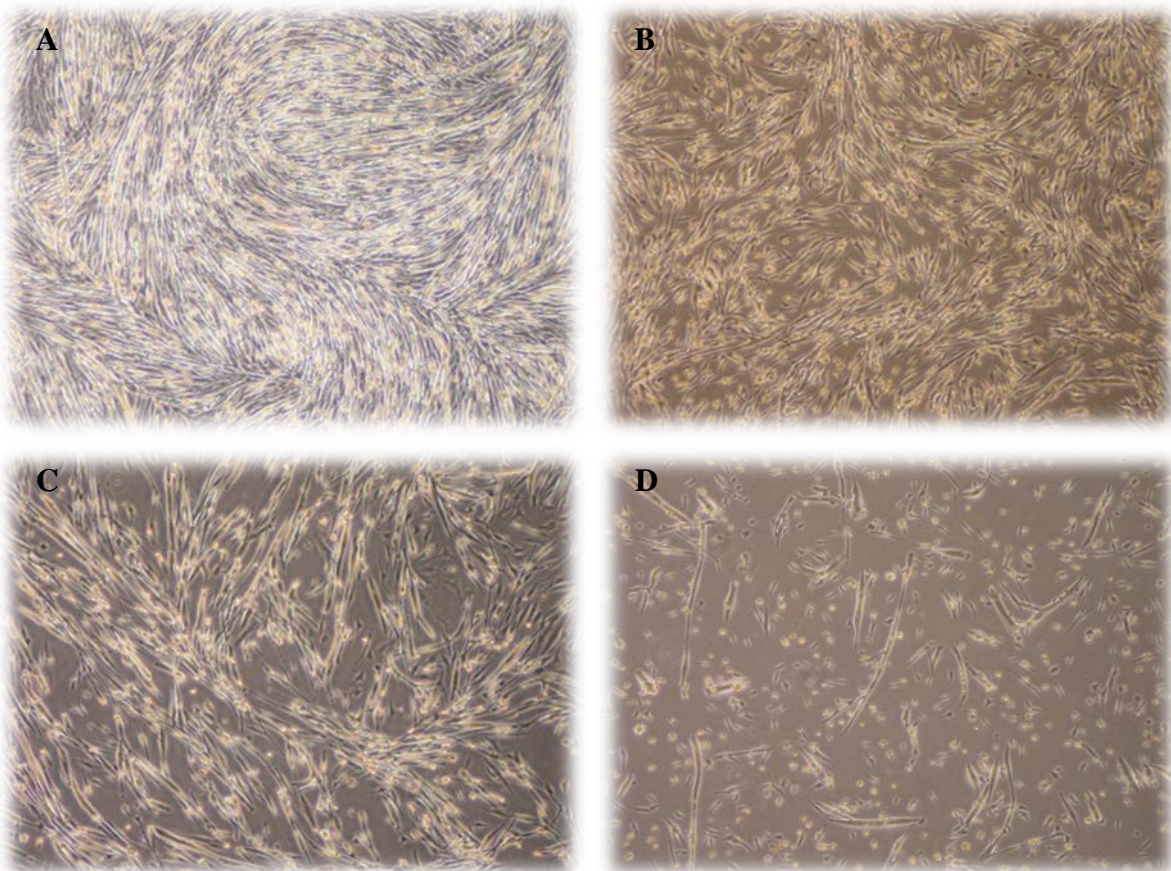
Det ble arbeidet med satellittceller isolert fra 7 donorer, 3 villtype-mus og 4 NCU-G1-knockout-mus (for donorkarakteristika se appendiks 1.1.). Under utsåing og differensiering av satellittceller til forsøk ble det raskt sett tegn til at celler fra ulike donorer hadde en tendens til å oppføre seg ulikt. Satellittcellene utviste ulik grad av evne til å differensiere til myotuber og fibre etter differensiering varierte med hensyn på antall og lengde (figur 3.1 og 3.2).

For de primære cellelinjene fra villtype-musene, utviste noen av donorene, VT F1 og VT M5, god evne til å differensiere og dannet et høyt antall lange fibre (figur 3.1 A og B). Cellelinjene fra en annen donor, VT F3, utviste derimot dårligere evne til å danne fibre, og måtte derfor sås ut til forsøk flere ganger for å få dannet tilstrekkelig antall fibre for å kunne gå videre med til forsøk (figur 3.1 C).



Figur 3.1: Differensierte myotuber fra villtype-mus. Differensierte myotuber på dag 4 etter differensieringsstart, fra tre ulike villtype-donorer; VT F1 (A), VT M5 (B) og VT F3 (C). Bildene er tatt med 4x forstørrelse.

For de primære cellelinjene fra knockout-musene ble det også sett en tendens til variasjon mellom donorene, hvorav cellelinjene fra donorene KO F2 og KO M10 utviste en god differensieringsevne og dannet et høyt antall lange fibre (figur 3.2 A og C). Cellelinjene fra donoren KO M8 utviste ikke en like god differensieringsevne, og måtte sås ut flere ganger for å få dannet tilstrekkelig antall fibre for å kunne gå videre med forsøk (figur 3.2 B). De primære cellelinjene fra donoren KO M7 ble ekskludert fra denne oppgaven på grunn av manglende evne til å differensiere til et tilstrekkelig antall myotuber under de gitte betingelsene (figur 3.2 D).



Figur 3.2: Differensierte myotuber fra NCU-G1-knockout-mus. Differensierte myotuber på dag 4 etter differensieringsstart, fra tre ulike NCU-G1-knockout-donorer; KO F2 (A), KO M8 (B), KO M10 (C) og KO M7 (D). Bildene er tatt med 4x forstørrelse.

3.2 Oksidasjon og akkumulering av oljesyre

Preliminære studier på fibertypesammensetning tydet på at knockout-musene hadde en høyere andel av de glykolytiske type IIb-fibre sammenlignet med deres villtype-søsken [75]. Dette kan tyde på at NCU-G1 er involvert i reguleringen av energimetabolismen i skjelettmuskel. På bakgrunn av dette var det ønskelig å studere om det forelå noen forskjeller mellom myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus med hensyn på evnen til å akkumulere og oksidere oljesyre (OA).

3.2.1 Donorspesifikk oksidasjon og akkumulering av oljesyre

Siden forsøkene i denne masteroppgaven ble utført parallelt med isolering og oppskalering av de primære cellelinjene, ble det utført et ulikt antall forsøk på de primære cellelinjene fra hver donor. Dette kombinert med de observerte interindividuelle forskjellene med hensyn på differensieringsevne, antall fibre og fiberlengde, gjorde at det var ønskelig å behandle dataene fra hver enkelt donor separat for å se om det forelå noen forskjeller i evnen til å akkumulere og oksidere oljesyre mellom de ulike donorene. For å studere dette ble differensierte myotuber på dag 4 etter differensieringsstart inkubert i 4 timer med $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre. For å undersøke om substrattilgjengeligheten hadde noen betydning, ble den radioaktive oljesyren tilført myotubene i to ulike konsentrasjoner, henholdsvis 100 μM og 600 μM (appendiks 5.1 og 5.2).

Tabell 3.1 viser gjennomsnittsverdiene for oksidasjon av $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre hos myotuber fra de ulike donorene ved de to oljesyrekonsentrasjonene. Myotubene fra donoren KO M10 skilte seg tydelig ut, ved at den hadde nesten dobbelt så høy oksidasjon av $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre for begge oljesyrekonsentrasjonene, sammenlignet med myotubene fra de andre knockout-donorene. Med unntak av KO M10, så det ut til at det forelå en tendens til at gjennomsnittene for oksidasjon av $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre hos myotubene fra knockout-donorene lå lavere enn myotubene fra villtype-donorene. I tillegg ble det observert en tendens til at oljesyreoksidasjonen var høyest for den høyeste fettsyrekonsentrasjonen (600 μM), sammenlignet med 100 μM oljesyre.

Tabell 3.1: Oksidasjon av [1-¹⁴C]oljesyre hos NCU-G1-knockout- og villtype-myotuber.

Differensierte myotuber ble på dag 4 etter differensieringsstart inkubert i 4 timer med [1-¹⁴C]oljesyre i to ulike konsentrasjoner, henholdsvis 100 µM og 600 µM oljesyre (OA). Myotubenes oksidasjon av [1-¹⁴C]oljesyre ble målt som frisatt CO₂. For hver donor ble det utført 2-10 forsøk (n), med 8-12 paralleller per forsøk. Data er gitt som absoluttverdier (nmol/mg) og presentert som gjennomsnitt ± SEM.

Donor	ID	Oksidasjon av 100 µM OA ± SEM	n	Oksidasjon av 600 µM OA ± SEM	n
VT	VT F1	28,03 ± 4,91	10	36,14 ± 6,46	9
	VT M5	28,08 ± 8,44	5	30,26 ± 11,87	4
	VT F3	20,31 ± 1,37	3	20,60 ± 2,66	2
KO	KO F2	13,99 ± 2,55	9	21,88 ± 3,57	8
	KO M8	19,32 ± 1,50	3	26,26 ± 4,58	2
	KO M10	34,34 ± 6,33	3	39,50 ± 6,48	2

Akkumulering av [1-¹⁴C]oljesyre, representert ved celleassosiert oljesyre (CA), viste en tendens til at de cellelinjene som hadde høyest oksidasjon av oljesyre, også hadde høyest akkumulering av oljesyre (tabell 3.2). Det ble observert en tendens til at myotubene fra donoren KO M10 hadde nesten dobbel så høy akkumulering, sammenlignet med myotubene fra de andre knockout-donorene.

Tabell 3.2: Akkumulering av [1-¹⁴C]oljesyre hos NCU-G1-knockout- og villtype-myotuber.

Differensierte myotuber ble på dag 4 etter differensieringsstart inkubert i 4 timer med [1-¹⁴C]oljesyre i to ulike konsentrasjoner, henholdsvis 100 µM og 600 µM oljesyre (OA). Myotubenes akkumulering av [1-¹⁴C]oljesyre ble målt som celleassosiert oljesyre (CA). For hver donor ble det utført 2-10 forsøk (n), med 8-12 paralleller per forsøk. Data er gitt som absoluttverdier (nmol/mg) og presentert som gjennomsnitt ± SEM.

Donor	ID	Celleassosiasjon av 100 µM OA ± SEM	n	Celleassosiasjon av 600 µM OA ± SEM	n
VT	VT F1	30,12 ± 5,53	10	55,92 ± 10,94	9
	VT M5	37,31 ± 8,39	5	43,85 ± 15,27	4
	VT F3	24,15 ± 1,78	3	29,62 ± 4,70	2
KO	KO F2	26,59 ± 4,04	9	47,61 ± 7,78	8
	KO M8	26,97 ± 3,85	3	43,14 ± 6,92	2
	KO M10	50,53 ± 12,08	3	59,06 ± 10,81	2

For å kunne si noe om hvor stor andelen av den radioaktive oljesyren som ble oksidert i forhold til den totale mengden som ble tatt opp i cellene, ble fraksjonell oksidasjon ($\text{CO}_2/(\text{CO}_2 + \text{CA})$) beregnet. Den fraksjonelle oksidasjonen viste at omtrent 40 % av den radioaktive oljesyren som ble tatt opp av cellene ble oksidert uavhengig av oljesyrekonsentrasjon, for samtlige donorer. Resultatene tydet på at knockout-mytubene utviste en tendens å ha en lavere fraksjonell oksidasjon enn villtype-mytubene. Knockout-mytubene hadde en fraksjonell oksidasjon på omtrent 38 % og 34 % for henholdsvis 100 μM og 600 μM oljesyre, i motsetning til villtype-mytubene som hadde en fraksjonell oksidasjon på omtrent 45 % og 40 %, for 100 μM og 600 μM oljesyre (tabell 3.3).

Tabell 3.3: Fraksjonell oksidasjon av $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ oljesyre hos NCU-G1-knockout- og villtype-mytuber.

Differensierte myotuber ble på dag 4 etter differensieringsstart inkubert i 4 timer med $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ oljesyre i to ulike konsentrasjoner, henholdsvis 100 μM og 600 μM oljesyre (OA). Fraksjonell oksidasjon av $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ oljesyre ble beregnet som $\text{CO}_2/(\text{CO}_2 + \text{CA})$. For hver donor ble det utført 2-10 forsøk (n), med 8-12 paralleller per forsøk. Data er gitt som absoluttverdier (nmol/mg) og presentert som gjennomsnitt \pm SEM.

Donor	ID	Fraksjonell oksidasjon av 100 μM OA \pm SEM	n	Fraksjonell oksidasjon av 600 μM OA \pm SEM	n
VT	VT F1	0,47 \pm 0,04	10	0,40 \pm 0,03	9
	VT M5	0,41 \pm 0,02	5	0,40 \pm 0,03	4
	VT F3	0,45 \pm 0,02	3	0,42 \pm 0,01	2
KO	KO F2	0,35 \pm 0,04	9	0,32 \pm 0,03	8
	KO M8	0,42 \pm 0,03	3	0,38 \pm 0,00	2
	KO M10	0,41 \pm 0,02	3	0,40 \pm 0,00	2

3.2.2 Oksidasjon og akkumulering av oljesyre

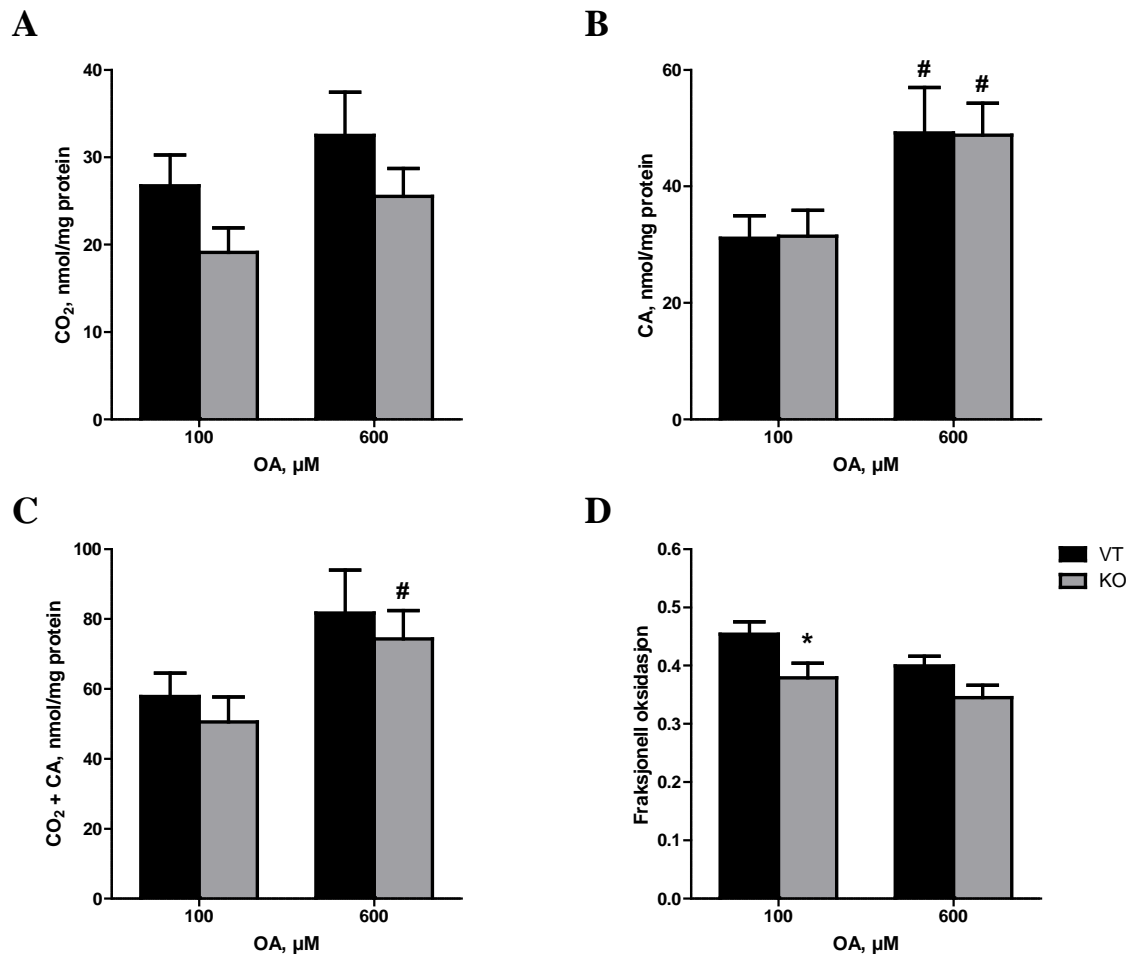
For å undersøke om det samlet forelå noen forskjell i akkumulering og oksidasjon av oljesyre mellom myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus, ble gjennomsnittene fra hvert enkelt forsøk samlet i sin respektive donorgruppe (avsnitt 3.2.1).

Resultatene viste en tendens til at oksidasjon av $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre var lavere hos knockout-myotubene sammenlignet med villtype-myotubene (figur 3.3 A). For 100 μM oljesyre ble det observert en 1,4 ganger høyere oljesyreoksidasjon hos villtype-myotubene sammenlignet med knockout-myotubene, mens for 600 μM ble det observert en 1,3 ganger høyere oksidasjon hos villtype-myotubene.

Akkumulering, representert som celleassosiert oljesyre (CA), av $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre viste ingen forskjell mellom knockout- og villtype-myotubene, verken for 100 μM eller 600 μM oljesyre (figur 3.3 B). For å få et inntrykk av myotubenes evne til å ta opp $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre, ble andelen akkumulert og oksidert oljesyre summert (CA + CO_2) (figur 3.5 C). Resultatene viste en tendens til lavere opptak av oljesyre hos knockout-myotubene for både 100 μM og 600 μM oljesyre, sammenlignet med villtype-myotubene.

Beregning av fraksjonell oksidasjon viste hvor stor andel av $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyren som ble tatt opp som ble oksidert (figur 3.5.D). For 100 μM oljesyre ble det funnet en statistisk signifikant lavere fraksjonell oksidasjon hos knockout-myotubene, sammenlignet med villtype-myotubene ($p = 0,029$). For 600 μM oljesyre ble det observert en tendens til at knockout-myotubene hadde en lavere fraksjonell oksidasjon enn villtype-myotubene, men resultatet var ikke statistisk signifikant ($p = 0,051$).

Det ble observert at en økt substrattilgjengelighet førte til en signifikant økt akkumulering av $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre hos både villtype- og knockout-myotuber ($p = 0,036$, $p = 0,021$). For knockout-myotubene ble det funnet et signifikant høyere opptak ved 600 μM oljesyre sammenlignet med 100 μM oljesyre ($p = 0,036$). Hos villtype-myotubene ble det observert en tendens til høyere opptak ved 600 μM .



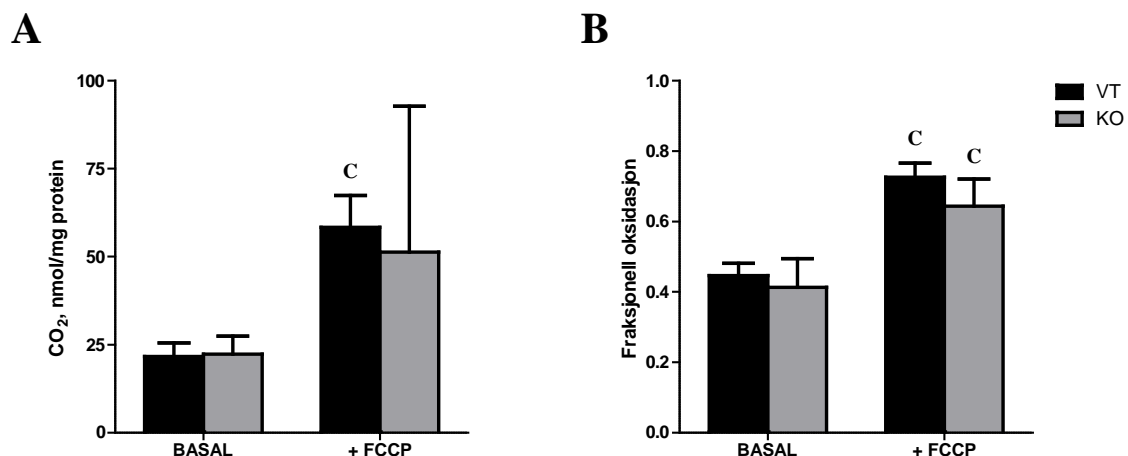
Figur 3.3: Oksidasjon, akkumulering, opptak og fraksjonell oksidasjon av $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre.

Differensierte myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus ble på dag 4 etter differensieringsstart inkubert i 4 timer med $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre, med to ulike konsentrasjoner (100 μM og 600 μM). Myotubenes oksidasjon av $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre ble målt som frisatt CO_2 (A), akkumulering av $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre ble målt som celleassosiert $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre (CA) (B), opptak av $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre ble beregnet som $\text{CO}_2 + \text{CA}$ (C) og fraksjonell oksidasjon av $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre ble beregnet som $\text{CO}_2/(\text{CO}_2 + \text{CA})$ (D). Data er gitt i absoluttverdier (nmol/mg) og illustreres som gjennomsnitt \pm SEM. Det ble utført 12-18 forsøk per donorgruppe, med 8-12 paralleller per forsøk. *: $p < 0,05$ mot villtype, #: $p < 0,05$ mot 100 μM OA.

3.2.3 Effekt av FCCP på oksidasjon av oljesyre

Det var ønskelig å undersøke om det forelå noen forskjell mellom myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus med hensyn på deres maksimale oksidasjonskapasitet for oljesyre. For å studere dette ble myotubene på dag 4 etter differensieringsstart inkubert i 4 timer med 100 μM $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre både med og uten 1 μM FCCP (appendiks 5.3.).

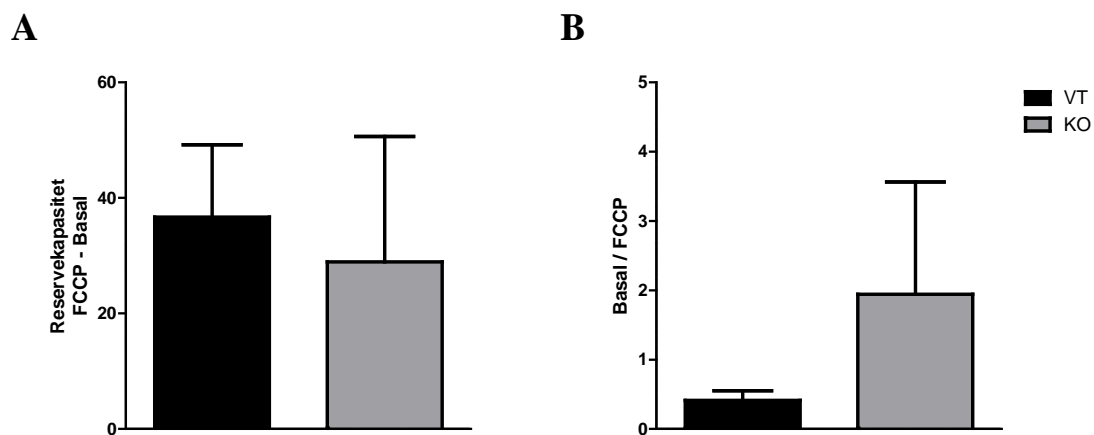
Tilsetning av FCCP økte signifikant oljesyreoksidasjonen hos villtype-myotubene ($p = 0,020$), og utviste en tendens til å øke oljesyreoksidasjonen hos knockout-myotubene (figur 3.4 A). Det ble ikke funnet noen forskjell i oljesyreoksidasjon mellom donorgruppene ved tilsetning av FCCP. For både knockout- og villtype-myotubene ble det funnet en statistisk signifikant økning i den fraksjonelle oksidasjonen av oljesyre ved tilsetning av FCCP ($p = 0,024$, $p = 0,0059$) (figur 3.4 B). Det ble observert en tendens til lavere fraksjonell oksidasjon ved tilsetning av FCCP hos knockout-myotubene sammenlignet med villtype-myotubene.



Figur 3.4: Effekt av FCCP på oksidasjon og fraksjonell oksidasjon av $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre. Differensierte myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus ble på dag 4 etter differensieringsstart inkubert i 4 timer med 100 μM $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre både med og uten med 1 μM FCCP. Myotubenes oksidasjon av $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre ble målt som frisatt CO_2 både uten FCCP (BASAL) og med FCCP (+FCCP) (A) og fraksjonell oksidasjon av $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre ble beregnet som $\text{CO}_2/(\text{CO}_2 + \text{CA})$ for både uten FCCP (BASAL) og med FCCP (+FCCP) (B). Data er gitt i absoluttverdier (nmol/mg) og illustreres som gjennomsnitt \pm SEM. Det ble utført 3 forsøk for hver donorgruppe med 8-12 paralleller per forsøk. C; $p < 0,05$ mot basal.

Det var ønskelig å undersøke om det var noen forskjell mellom knockout- og villtype-myotuber med hensyn på deres maksimale mitokondriekapasitet. For å studere dette ble myotubenes reservekapasitet (FCCP – BASAL) og hvor stor andel av denne reservekapasiteten myotubene benyttet seg av (BASAL/FCCP) beregnet (avsnitt 1.6.4).

Det ble ikke observert forskjeller mellom knockout- og villtype-myotuber med hensyn på deres reservekapasitet for oksidasjon av $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre (figur 3.5 A). Det ble observert en tendens til at knockout-myotubene benyttet seg mer av sin reservekapasitet, sammenlignet med villtype-myotubene (figur 3.5 B).



Figur 3.5: Effekter av FCCP på oksidasjon av $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre hos knockout- og villtype-myotuber.

Differensierte myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus ble på dag 4 etter differensieringsstart inkubert i 4 timer med $100\ \mu\text{M}$ $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre både med eller uten $1\ \mu\text{M}$ FCCP. Myotubenes reservekapasitet for oksidasjon av $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre ble estimert som differansen mellom oksidasjonen med og uten FCCP (FCCP – BASAL) (A) og andelen av reservekapasiteten myotubene benyttet seg av ble beregnet som oksidasjon uten FCCP dividert på oksidasjon med FCCP (BASAL/FCCP) (B). Data er gitt i absoluttverdier (nmol/mg) og illustreres som gjennomsnitt \pm SEM. Det ble utført 3 forsøk for hver donorgruppe med 8-12 paralleller per forsøk.

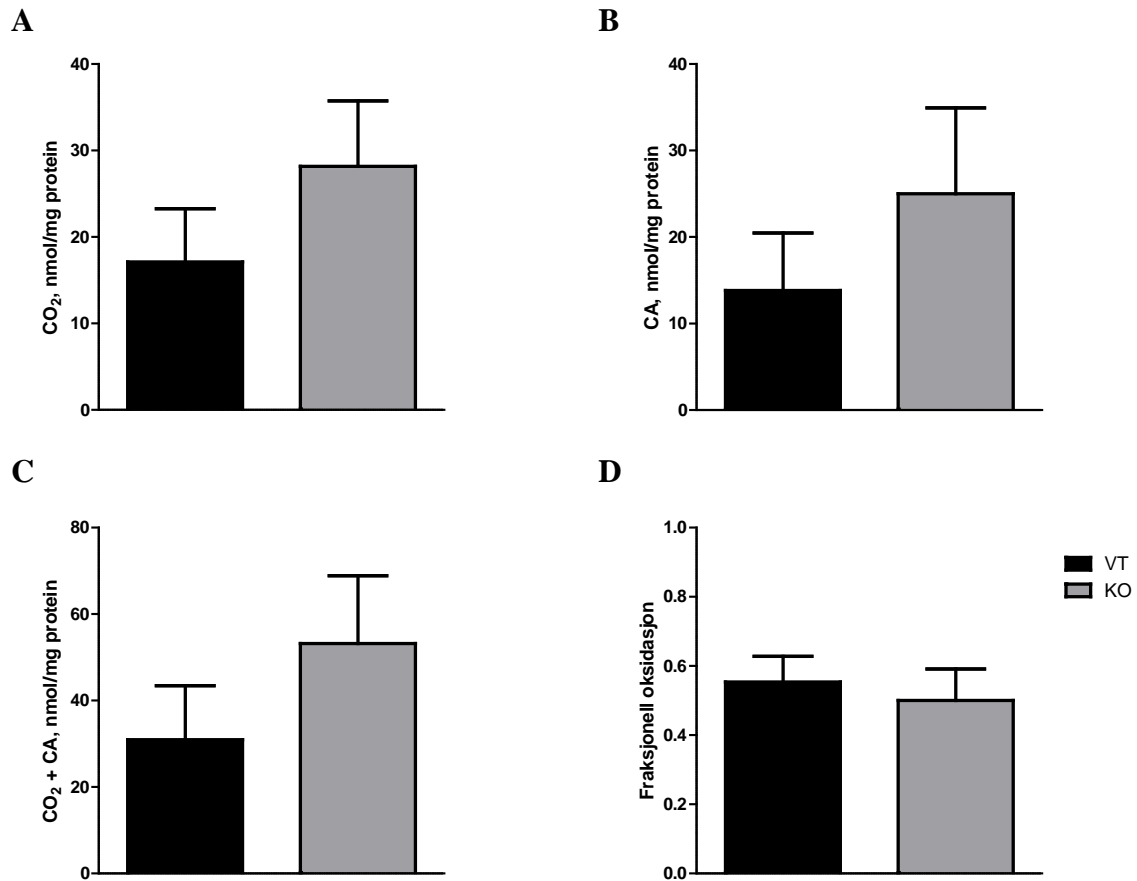
3.3 Oksidasjon og akkumulering av glukose

Som nevnt tidligere tydet preliminare studier på en høyere andel av de glykolytiske IIb-fibre hos knockout-musene, sammenlignet med villtype-musene [75]. På bakgrunn av dette og de observerte tendensene til lavere oljesyreoksidasjon hos knockout-myotubene, var det derfor interessant å undersøke om det var noen forskjell i akkumulering og oksidasjon av glukose mellom NCU-G1-knockout- og villtype-myotuber.

3.3.1 Basal oksidasjon og akkumulering av glukose

For å undersøke om det var noen forskjell i akkumulering og oksidasjon av glukose mellom knockout- og villtype-myotuber, ble myotubene på dag 4 etter differensieringsstart inkubert i 4 timer med D-[$^{14}\text{C}(\text{U})$]glukose, med en total konsentrasjon på 200 μM glukose (appendiks 5.4).

Resultatene viste en tendens til at både akkumulering og oksidasjon av glukose var høyere hos knockout-myotubene, sammenlignet med villtype-myotubene (figur 3.6 A og B). Knockout-myotubene oksiderte omtrent 1,7 ganger mer og akkumulerte 1,8 ganger mer enn villtype-myotubene. For opptaket av glukose ble den samme tendensen observert, hvorav knockout-myotubene tok opp 1,7 ganger mer glukose enn villtype-myotubene (figur 3.6 C). For den fraksjonelle oksidasjonen av glukose ble det ikke observert noen tendens til forskjell mellom donorgruppene. Knockout-myotubene oksiderte omtrent 50 % av glukosen som ble tatt opp, mens villtype-myotubene oksiderte omtrent 55 % av glukosen som ble tatt opp (figur 3.6 D).

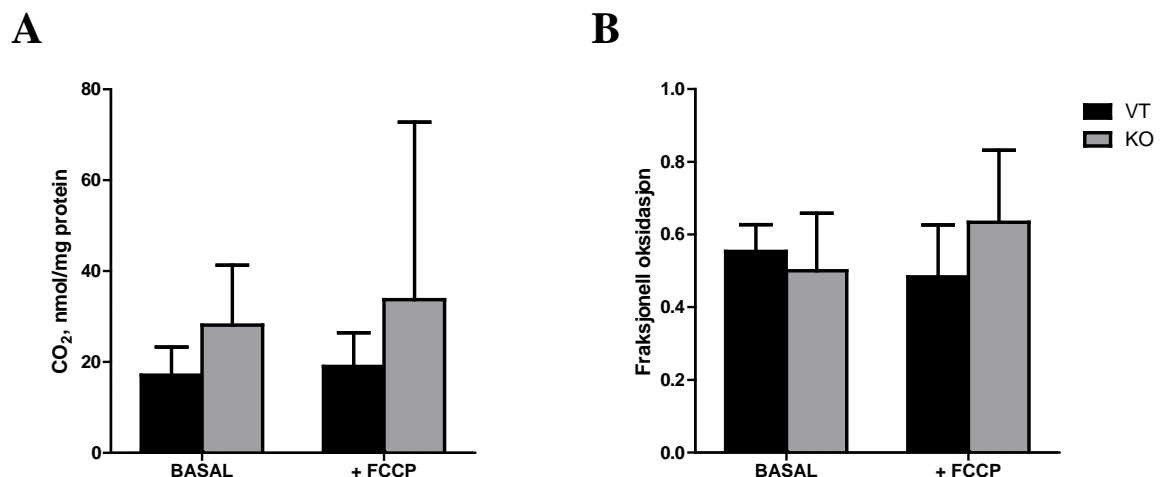


Figur 3.6: Oksidasjon, akkumulering og fraksjonell oksidasjon av D-[¹⁴C(U)]glukose. Differensierte myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus ble på dag 4 etter differensieringsstart inkubert i 4 timer med 200 μ M D-[¹⁴C(U)]glukose. Myotubenes oksidasjon av D-[¹⁴C(U)]glukose ble målt som frisatt CO₂ (A), akkumulering av D-[¹⁴C(U)]glukose ble målt som celleassosiert glukose (CA) (B), opptak av D-[¹⁴C(U)]glukose ble beregnet som CO₂ + CA (C) og fraksjonell oksidasjon av [¹⁴C(U)]glukose ble beregnet som CO₂/(CO₂ + CA) (D). Data er gitt i absoluttverdier (nmol/mg) og illustreres som gjennomsnitt \pm SEM. Det ble utført 3 forsøk per donorgruppe, med 12 paralleller per forsøk.

3.3.2 Effekt av FCCP på oksidasjon av glukose

Det var også ønskelig å undersøke om det forelå noen forskjell mellom myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus med hensyn på deres maksimale oksidasjonskapasitet for glukose. For å studere dette ble myotubene på dag 4 etter differensieringsstart inkubert i 4 timer med 200 μM D-[^{14}C (U)]glukose både med og uten 1 μM FCCP (appendiks 5.5.).

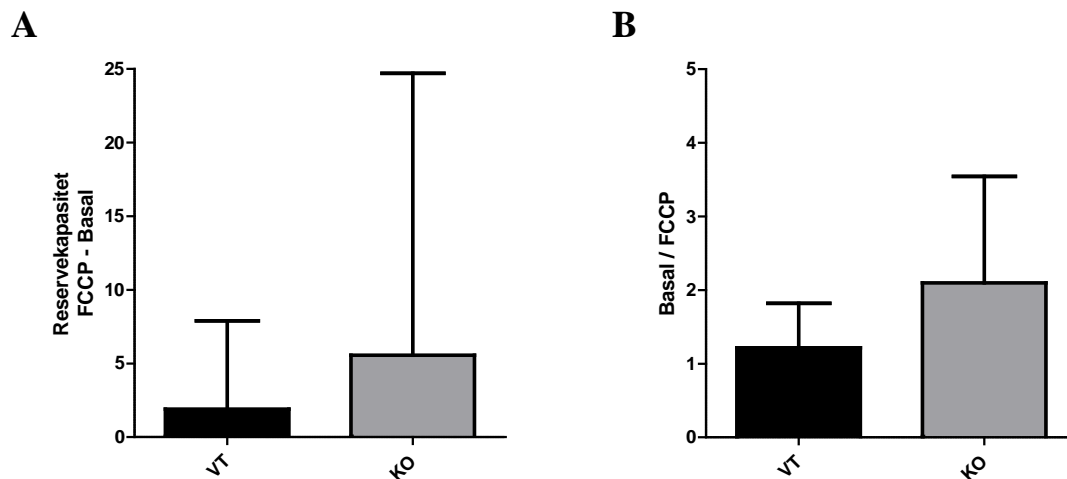
Tilsetning av FCCP viste en tendens til å øke glukoseoksidasjonen hos både knockout- og villtype-myotuber (figur 3.7 A). Det ble ikke funnet noen forskjell i glukoseoksidasjonen mellom knockout- og villtype-myotubene ved tilsetning av FCCP. Den fraksjonelle oksidasjonen av glukose utviste en tendens til å ligge litt høyere hos knockout-myotubene etter tilsetning av FCCP, sammenlignet med villtype-myotubene (figur 3.7 B).



Figur 3.7: Effekt av FCCP på oksidasjon og fraksjonell oksidasjon av D-[^{14}C (U)]glukose.

Differensierte myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus ble på dag 4 etter differensieringsstart inkubert i 4 timer med 200 μM D-[^{14}C (U)]glukose både med og uten 1 μM FCCP. Myotubenes oksidasjon av D-[^{14}C (U)]glukose ble målt som frisatt CO_2 både uten FCCP (BASAL) og med FCCP (+FCCP) (A) og fraksjonell oksidasjon av D-[^{14}C (U)]glukose ble beregnet for både uten FCCP (BASAL) og med FCCP (+FCCP) (B). Data er gitt i absoluttverdier (nmol/mg) og illustreres som gjennomsnitt \pm SEM. Det ble utført 3 forsøk for hver donorgruppe med 8-12 paralleller per forsøk.

For å undersøke myotubenes maksimale mitokondriekapasitet for oksidasjon av glukose ble reservekapasiteten (FCCP- BASAL) og andel av reservekapasiteten myotubene benyttet seg av (BASAL/FCCP) beregnet (avsnitt 1.6.4). Det ble ikke observert forskjeller i reservekapasiteten for oksidasjon av glukose mellom knockout- og villtype-myotuber (figur 3.8 A). Resultatene viste en tendens til at knockout-myotubene benyttet seg mer av sin reservekapasitet sammenlignet med villtype-myotubene (figur 3.8 B).



Figur 3.8: Effekter av FCCP på oksidasjon av D-[¹⁴C(U)]glukose hos knockout- og villtype-myotuber. På dag 4 etter differensieringsstart ble myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus inkubert i 4 timer med 200 μ M D-[¹⁴C(U)]glukose både med eller uten 1 μ M FCCP. Myotubenes reservekapasitet for oksidasjon av D-[¹⁴C(U)]glukose ble estimert som differansen mellom oksidasjonen med og uten FCCP (FCCP - BASAL) (**A**) og andelen av reservekapasiteten myotubene benyttet seg av ble beregnet som oksidasjon uten FCCP dividert på oksidasjon med FCCP (BASAL/FCCP) (**B**). Data er gitt i absoluttverdier (nmol/mg) og illustreres som gjennomsnitt \pm SEM. Det ble utført 3 forsøk for hver donorgruppe med 8-12 paralleller per forsøk.

3.4 Substratpreferanse og suppressibilitet

Skjelettmuskel benytter både glukose og fettsyrer til sin energiproduksjon, og det foreligger et dynamisk samspill mellom disse. Det har blitt vist at oksidasjon av fettsyrer kan hemme opptak og oksidasjon av glukose, og vice versa (avsnitt 1.3.3). Det var derfor ønskelig å undersøke om det var noen forskjeller mellom myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus med hensyn på deres substratpreferanse og samspillet mellom glukose og oljesyre som energikilde.

3.4.1 Substratpreferanse

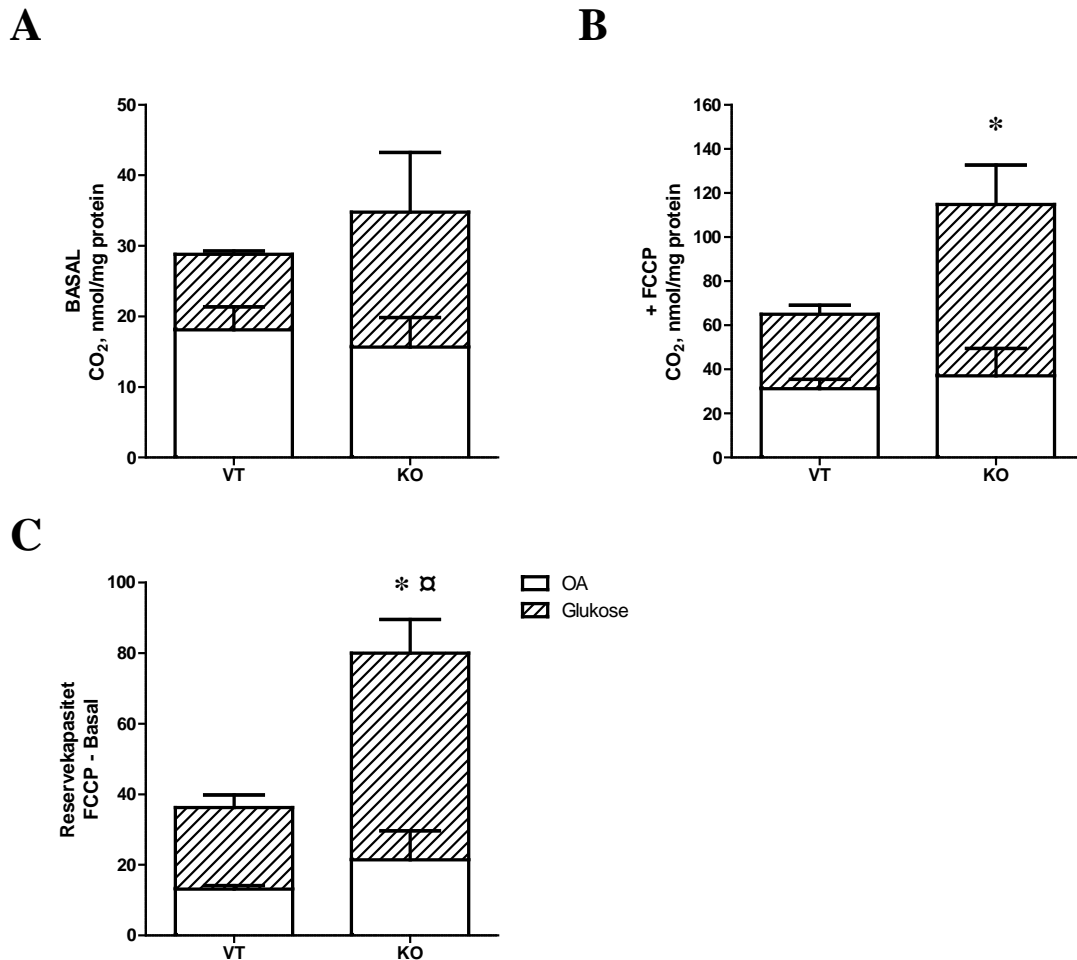
For å undersøke om det var noen forskjell i substratpreferanse mellom knockout- og villtype-myotuber, ble myotubene på dag 4 etter differensieringsstart behandlet akutt med enten 100 μM $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ oljesyre tilsatt 200 μM umerket glukose, eller 200 μM $\text{D-}[^{14}\text{C}(\text{U})]$ glukose tilsatt 100 μM umerket oljesyre (appendiks 5.6 og 5.7). For å kunne estimere maksimal oksidativ kapasitet ble 1 μM FCCP tilsatt i 8 av 20 paralleller.

Totaloksidasjon ble beregnet ved å legge sammen absoluttverdiene for gjennomsnittlig oksidasjon med $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ oljesyre tilsatt 200 μM umerket glukose og absoluttverdiene for gjennomsnittlig oksidasjon med $\text{D-}[^{14}\text{C}(\text{U})]$ glukose tilsatt 100 μM umerket oljesyre (figur 3.9). Det ble observert en tendens til en høyere totaloksidasjon hos knockout-myotubene sammenlignet med villtype-myotubene (figur 3.9 A). Det forelå en tendens til forskjell mellom donorene med hensyn på deres substratpreferanse, ved at knockout-myotubene utviste en tendens til høyere oksidasjon av glukose sammenlignet med villtype-myotubene.

Ved tilsetning av FCCP ble det funnet en statistisk signifikant økt totaloksidasjon hos knockout-myotubene sammenlignet med villtype-myotubene ($p = 0,021$), hvorav knockout-myotubene utviste en 1,6 ganger høyere totaloksidasjon enn villtype-myotubene (figur 3.9 B). Det ble observert en tendens til at denne økningen kunne tilskrives en økt oksidasjon av glukose, da det forelå en omtrent 1,8 ganger høyere glukoseoksidasjon hos knockout-myotubene.

Hos knockout-myotubene ble det også funnet en statistisk signifikant høyere reservekapasitet for totaloksidasjon, med en omtrent dobbelt så høy totaloksidasjon sammenlignet med villtype-myotubene ($p = 0,0034$) (figur 3.9 C). I tillegg ble det funnet en signifikant høyere

reservekapasitet for oksidasjon av glukose hos knockout-mytubene sammenlignet med villtype-mytubene, hvorav knockout-mytubene hadde en 2,2 ganger høyere reservekapasitet for oksidasjon av glukose ($p = 0,025$) (figur 3.9 C).



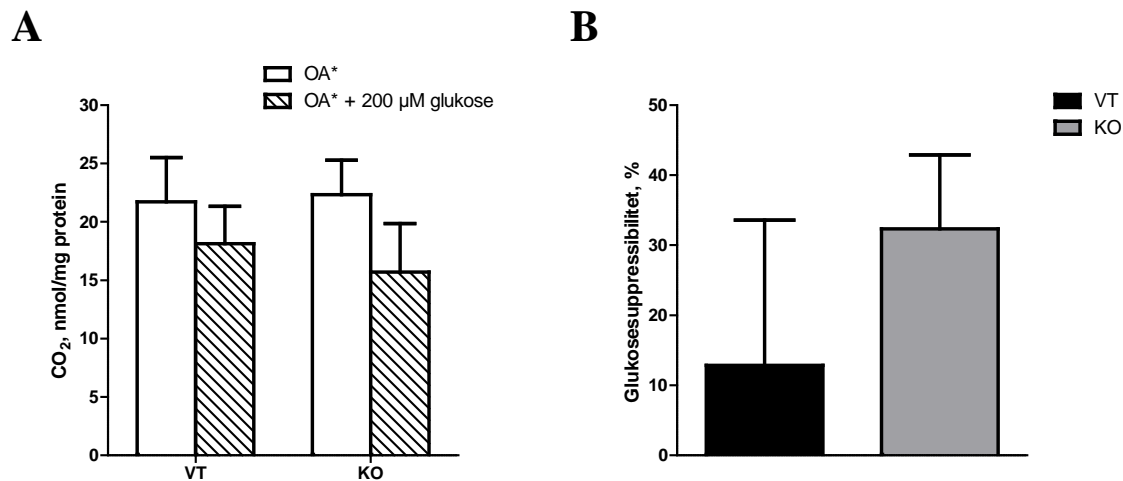
Figur 3.9: Basal totaloksidasjon, effekt av FCCP, reservekapasitet og andeler. Differensierte myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus ble på dag 4 etter differensieringsstart inkubert i 4 timer med enten 100 μM [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oljesyre tilsatt 200 μM umerket glukose eller 200 μM D- ^{14}C (U)glukose tilsatt 100 μM umerket oljesyre. For 8 av 20 paralleller ble 1 μM FCCP tilsatt. Myotubenes totaloksidasjon av [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oljesyre (OA) og D- ^{14}C (U)glukose (Glukose) ble målt som frisatt CO_2 (BASAL) (A), maksimal oksidasjonskapasitet ble målt som oksidasjon av [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oljesyre og D- ^{14}C (U)glukose etter tilsetning av FCCP (+FCCP) (B) og reservekapasiteten for oksidasjon av [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oljesyre og D- ^{14}C (U)glukose ble estimert som differansen mellom oksidasjonen med og uten FCCP (FCCP – BASAL) (C). For hver figur vises i tillegg hvor stor andel de enkelte radioaktive substratene bidro til den totale oksidasjonen. Data er gitt i absoluttverdier (nmol/mg) og illustreres som gjennomsnitt \pm SEM. Det ble utført 3 forsøk for hver donorgruppe med 8-12 paralleller per forsøk. *; $p < 0,05$ mot villtype (totaloksidasjon), □; $p < 0,05$ mot villtype (glukoseoksidasjon).

3.4.2 Suppressibilitet av glukose på oljesyreoksidasjon

Suppressibilitet er et begrep som kan benyttes for å undersøke metabolsk fleksibilitet *in vitro*, og er et mål på evnen cellene har til å undertrykke fettsyreoksidasjonen i respons til tilsetning av glukose (avsnitt 1.3.3). Det har blitt observert tendenser til lavere oljesyreoksidasjon og høyere glukoseoksidasjon hos knockout-mytubene, sammenlignet med villtype myotubene (avsnitt 3.2.2 og 3.3.1). På bakgrunn av dette var det derfor ønskelig å undersøke om det kunne foreligge en forskjell mellom donorgruppene med hensyn på deres evne til å undertrykke fettsyreoksidasjonen i respons til tilsetning av glukose (suppressibilitet). For å undersøke dette ble myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus på dag 4 etter differensieringsstart inkubert i 4 timer med 100 μM [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oljesyre, alene eller sammen med 200 μM umerket glukose (appendiks 5.3. og 5.6.). Suppressibilitet ble beregnet ved hjelp av gjennomsnittsverdier for oksidasjon (CO_2) i absoluttverdier (nmol/mg) etter følgende formel;

$$6) \quad \left(1 - \left(\frac{(\text{CO}_2 \text{ (med kaldt substrat)})}{(\text{CO}_2 \text{ (uten kaldt substrat)})} \right) \right) * 100 \%$$

Resultatene viste en tendens til lavere oljesyreoksidasjon i nærvær av 200 μM umerket glukose hos både knockout- og villtype-mytubene (figur 3.10 A). Det ble observert en tendens til en høyere suppressibilitet av oljesyreoksidasjonen etter tilsetning av glukose hos knockout-mytubene sammenlignet med villtype-mytubene (figur 3.10 B). Dette tilsier at knockout-mytubene utviste en tendens til å kunne undertrykke oljesyreoksidasjonen mer enn villtype-mytubene i nærvær av glukose.

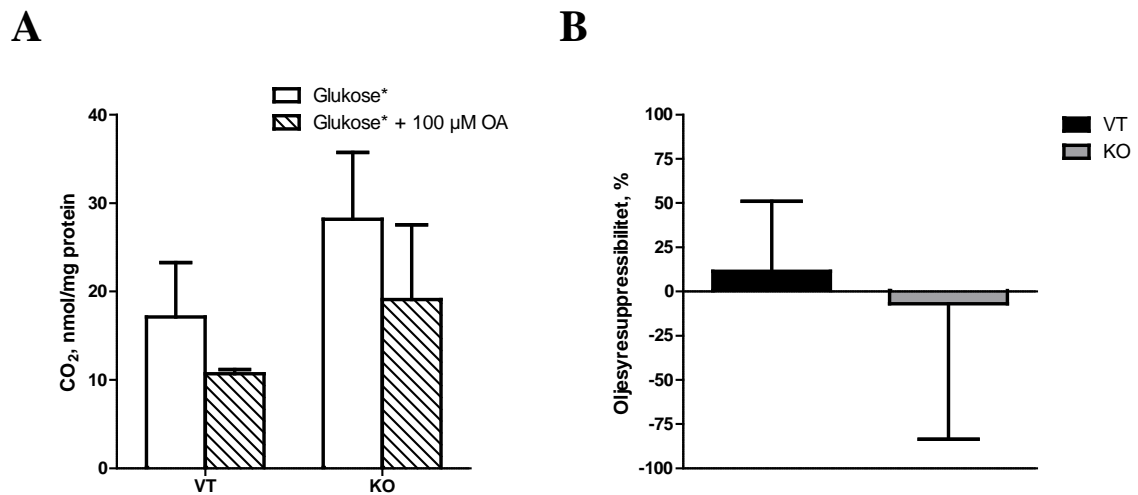


Figur 3.10: Suppressibilitet av oksidasjon av [1-¹⁴C]oljesyre hos myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus. Differensierte myotuber fra knockout- og villtype-mus ble på dag 4 etter differensieringsstart inkubert i 4 timer med enten 100 μM [1-¹⁴C]oljesyre alene eller sammen med 200 μM umerket glukose. Myotubenes oksidasjon av [1-¹⁴C]oljesyre alene (OA*) eller sammen med 200 μM umerket glukose (OA* +200 μM glukose) ble målt som frisatt CO₂ (A) og suppressibiliteten i prosent ble beregnet (B). Data illustreres som gjennomsnitt ± SEM. Det ble utført 3 forsøk for hver donorgruppe med 12 paralleller per forsøk.

3.4.3 Suppressibilitet av oljesyre på glukoseoksidasjon

Tilsvarende som i avsnitt 3.4.2, var det var også ønskelig å undersøke om det forelå noen forskjell mellom NCU-G1-knockout- og villtype-myotuber med hensyn på deres evne til å undertrykke glukoseoksidasjonen i respons til tilsetning av oljesyre. For å undersøke dette ble myotubene på dag 4 etter differensieringsstart inkubert i 4 timer med 200 μM D-[¹⁴C(U)]glukose, alene eller sammen med 100 μM umerket oljesyre (appendiks 5.4. og 5.7.). Suppressibilitet ble beregnet etter samme formel som i avsnitt 3.4.2.

Resultatene viser en tendens til lavere glukoseoksidasjon etter tilsetning av 100 μM oljesyre hos både knockout- og villtype-myotubene (figur 3.11 A). Det ble observert en mulig tendens til en høyere suppressibilitet hos villtype-myotubene sammenlignet med knockout-myotubene (figur 3.11 B).



Figur 3.11: Suppressibilitet av oksidasjon av D-[¹⁴C(U)]glukose hos myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus. Differensierte myotuber fra knockout- og villtype-mus ble på dag 4 etter differensieringsstart inkubert i 4 timer med enten 200 μM D-[¹⁴C(U)]glukose alene eller sammen med 100 μM umerket oljesyre. Myotubenes oksidasjon av D-[¹⁴C(U)]glukose alene (Glukose*) eller sammen med 100 μM umerket oljesyre (OA) (Glukose* + 100 μM OA) ble målt som frisatt CO₂ (A) og suppressibiliteten i prosent ble beregnet (B). Data illustreres som gjennomsnitt ± SEM. Det ble utført 3 forsøk for hver donorgruppe med 12 paralleller per forsøk.

3.5 Effekt av agonister på oksidasjon og akkumulering av oljesyre

Steffensen et al. viste at når hNCU-G1 og PPAR α ble uttrykt samtidig førte det til økt transkripsjon fra en promotor inneholdende et PPRE fra et kjent PPAR α -målgen, og det ble vist at denne effekten var ligandavhengig. Dette førte til teorien om at NCU-G1 kan være en mulig koaktivator for PPAR α (avsnitt 1.5.1). Siden PPRE ikke nødvendigvis er selektive for de ulike isoformene av PPAR (avsnitt 1.4), kan det ikke utelukkes at NCU-G1 kan ha en mulig koaktiverende effekt på andre medlemmer av PPAR-familien. Siden PPAR-familien spiller viktige roller i regulering av energimetabolismen i skjelettmuskel, var det derfor av interesse å undersøke om det forelå noen forskjell mellom myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus, med hensyn på effekten av PPAR-agonister på akkumulering og oksidasjon av oljesyre.

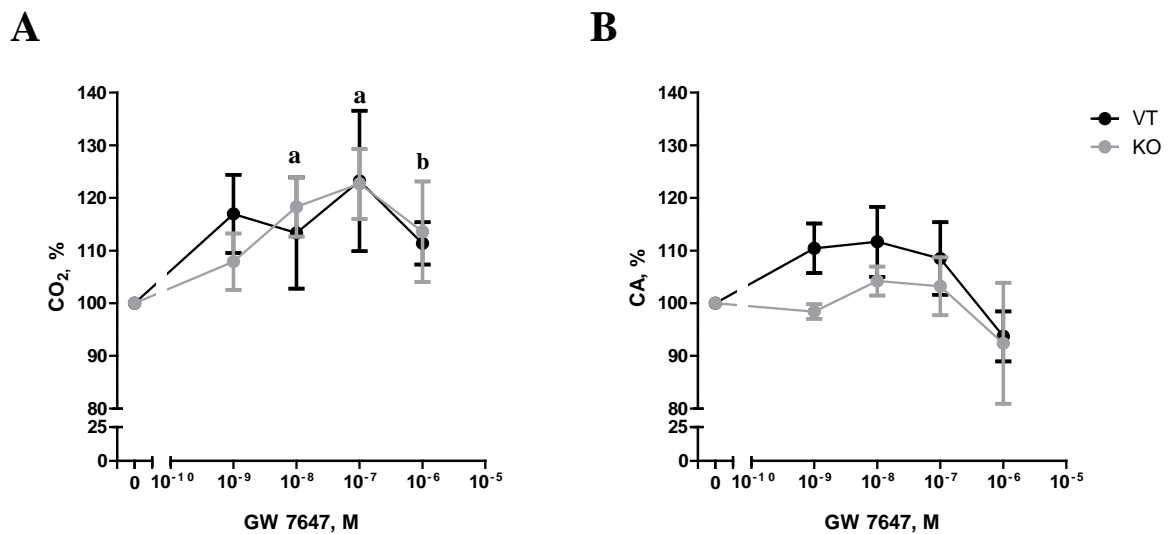
3.5.1 Effekt av PPAR α -agonist på oksidasjon og akkumulering av oljesyre

PPAR α spiller en viktig rolle i energimetabolismen i skjelettmuskel, og aktivering av PPAR α i skjelettmuskel har blant annet blitt vist til å øke fettsyreoksidasjonen (avsnitt 1.4.1). På bakgrunn av dette var det av interesse å undersøke om det forelå noen forskjell mellom myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus, med hensyn på effekten av en PPAR α -agonist på akkumulering og oksidasjon av oljesyre. For å studere dette ble myotubene forbehandlet med en PPAR α -agonist (GW 7647) i 2 dager, før de på selve forsøksdagen ble inkubert i 4 timer med [1- 14 C]oljesyre. For å undersøke om substrattilgjengeligheten hadde noen betydning for effekten av agonisten, ble den radioaktive oljesyren tilført myotubene i to ulike konsentrasjoner, henholdsvis 100 μ M og 600 μ M (appendiks 5.1 og 5.2).

Resultatene viste en stimulerende effekt av behandling med GW 7647 på oksidasjon av 100 μ M oljesyre hos både knockout- og villtype-myotubene (figur 3.12 A). For knockout-myotubene ble det funnet en statistisk signifikant økt oljesyreoksidasjon ved konsentrasjonene av agonisten på 10^{-7} og 10^{-8} M, sammenlignet med ubehandlet kontroll ($p = 0,019$, $p = 0,023$, parret t-test). For villtype-myotubene det funnet en signifikant økning i oksidasjonen ved en konsentrasjon av agonisten på 10^{-6} M mot ubehandlet kontroll ($p = 0,030$, parret t-test). For

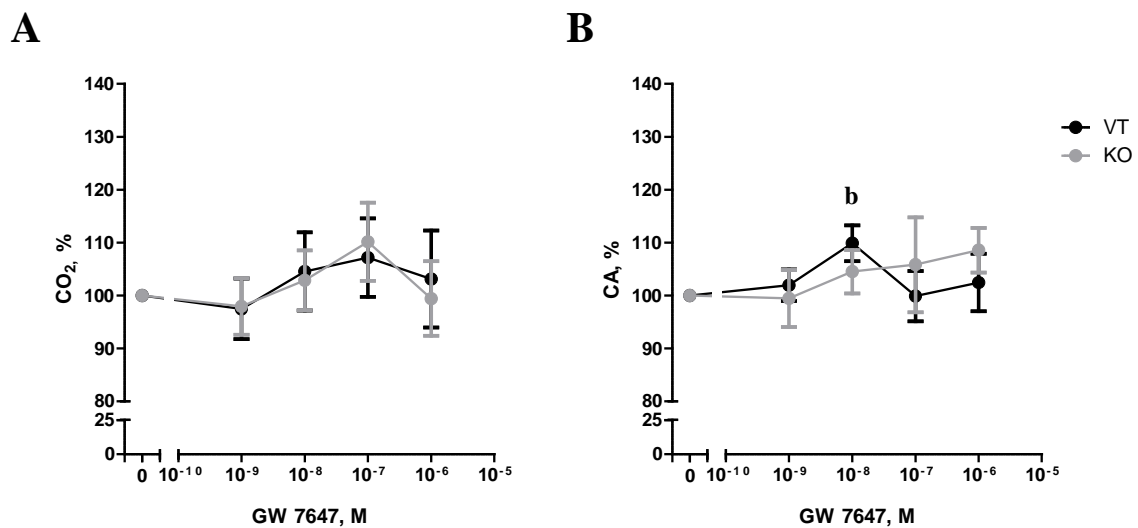
akkumulering av oljesyre ble det ikke observert noen effekt av agonisten hos verken knockout- eller villtype-mytotubene (figur 3.12 B).

Samlet viste resultatene ingen tendens til at det forelå noen forskjell i effekt av behandling med GW 7647 på oljesyreoksidasjonen mellom knockout- og villtype-mytotuber (figur 3.12 A). For akkumulering av 100 μ M oljesyre ble det observert en mulig tendens til at det forelå en høyere akkumulering av oljesyre hos villtype-mytotubene, sammenlignet med knockout-mytotubene (figur 3.12 B).



Figur 3.12: Effekt av GW 7647 på oksidasjon og akkumulering av 100 μ M [1-¹⁴C]oljesyre. Differensierte myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus ble forbehandlet i 2 dager med GW 7647 med en konsentrasjon på 10⁻⁷ M, før de på dag 4 etter differensieringsstart ble inkubert i 4 timer med [1-¹⁴C]oljesyre, med en total oljesyrekonsentrasjon på 100 μ M. Myotubenes oksidasjon av [1-¹⁴C]oljesyre ble målt som frisatt CO₂ (A) og akkumulering av [1-¹⁴C]oljesyre ble målt som celleassosiert oljesyre (CA) (B). Data illustreres som gjennomsnitt av prosent av kontroll \pm SEM. Det ble utført 6-7 forsøk per donorgruppe, med 8 paralleller per forsøk. a; p < 0,05 mot ubehandlet knockout, b; p < 0,05 mot ubehandlet villtype.

Ved en høyere oljesyrekonsentrasjon (600 μ M) ble det observert en tendens til effekt av GW 7647 på oksidasjon av oljesyre, hos både knockout- og villtype-mytotubene (figur 3.13 A). For villtype-mytotubene ble det funnet en signifikant økt akkumulering av oljesyre ved en konsentrasjon av GW 7647 på 10⁻⁸ M mot ubehandlet kontroll (p = 0,028, parret t-test) (figur 3.13 B). Samlet ble det ikke observert noen tendens til at det forelå noen forskjell i effekt av behandling med GW 7647 mellom knockout- og villtype-mytotuber, verken for akkumulering eller oksidasjon av oljesyre (figur 3.13 A og B).



Figur 3.13: Effekt av GW 7647 på oksidasjon og akkumulering av 600 μ M [1-¹⁴C]oljesyre. Differensierte myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus ble forbehandlet i 2 dager med GW 7647 med en konsentrasjon på 10⁻⁷ M, før de på dag 4 etter differensieringsstart ble inkubert i 4 timer med [1-¹⁴C]oljesyre, med en total oljesyre konsentrasjon på 600 μ M. Myotubenes oksidasjon av [1-¹⁴C]oljesyre ble målt som frisatt CO₂ (A) og akkumulering av [1-¹⁴C]oljesyre ble målt som celleassosiert oljesyre (CA) (B). Data illustreres som gjennomsnitt av prosent av kontroll \pm SEM. Det ble utført 6-7 forsøk per donorgruppe, med 8 paralleller per forsøk. b; p < 0,05 mot ubehandlet villtype.

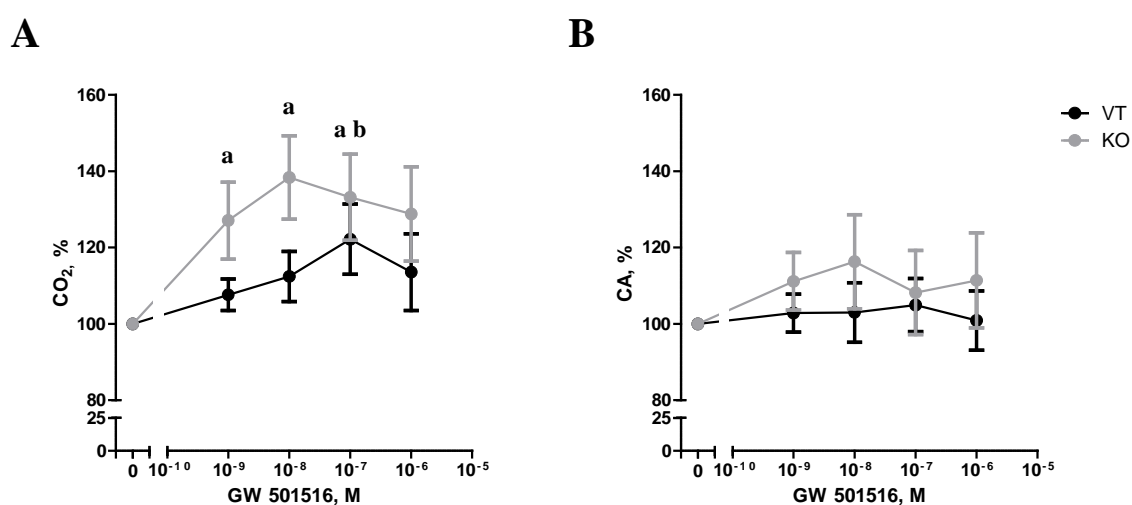
3.5.2 Effekt av PPAR β -agonist på oksidasjon og akkumulering av oljesyre

På bakgrunn av teorien om NCU-G1s mulige rolle som koaktivator, var det også interessant å undersøke om fravær av NCU-G1 kunne ha betydning for effekten av en PPAR β -agonist på akkumulering og oksidasjon av oljesyre. For å studere dette ble myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus forbehandlet med PPAR β -agonisten, GW 501516, i 2 dager, før de på selve forsøksdagen ble inkubert i 4 timer med [1-¹⁴C]oljesyre. Tilsvarende som tidligere, ble substrattilgjengeligheten undersøkt ved å tilføre den radioaktive oljesyren i to ulike konsentrasjoner, henholdsvis 100 μ M og 600 μ M (appendiks 5.1 og 5.2).

Resultatene viste en stimulerende effekt av behandling med GW 501516 på oksidasjon av 100 μ M oljesyre hos både knockout- og villtype-myotubene (figur 3.14 A). Ved konsentrasjonen av GW 501516 på 10⁻⁷ M ble det funnet en signifikant økt oljesyreoksidasjon hos villtype-myotubene sammenlignet med ubehandlet kontroll (p = 0,047, parret-test). Hos knockout-myotubene ble det funnet en signifikant økt oljesyreoksidasjon ved konsentrasjon av agonisten på 10⁻⁷, 10⁻⁸ og 10⁻⁹ M, mot ubehandlet kontroll (p = 0,032, p = 0,017, p = 0,044,

parret t-test). For akkumulering av 100 μM oljesyre ble det ikke observert noen effekt av GW 501516, hos verken knockout- eller villtype-myotubene (figur 3.14 B).

Det ble funnet en statistisk signifikant forskjell i effekt av behandling med GW 501516 mellom knockout- og villtype-myotubene, hvor knockout-myotubene hadde høyere respons av agonisten på oljesyreoksidasjon sammenlignet med villtype myotubene ($p = 0,014$, SPSS «Mixed model») (figur 3.14 A). For akkumulering av 100 μM oljesyre ble det observert en tendens til forskjell mellom knockout- og villtype-myotubene, hvorav knockout-myotubene utviste en tendens til høyere akkumulering av oljesyre (figur 3.14 B).

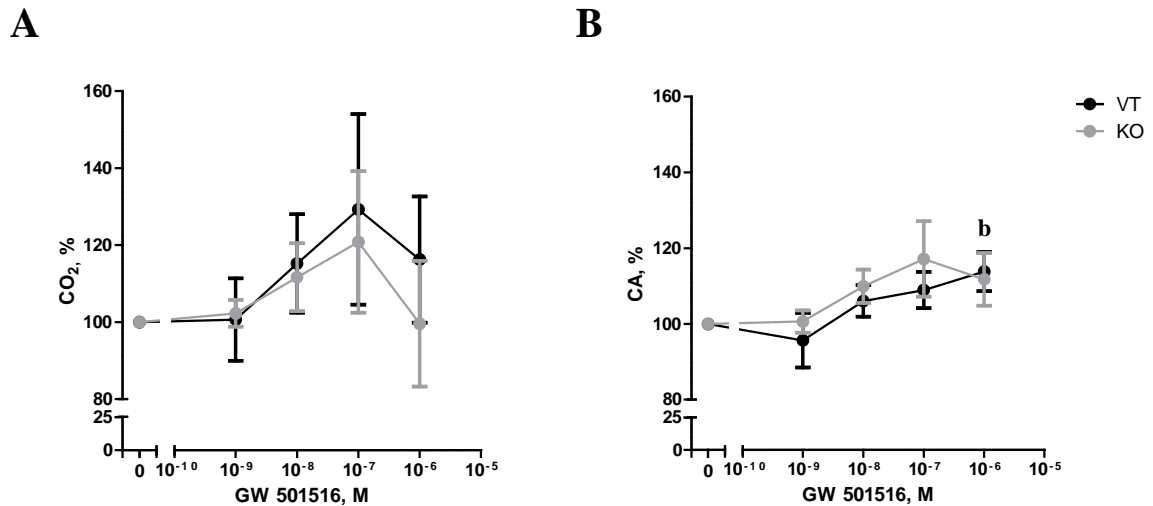


Figur 3.14: Effekt av GW 501516 på oksidasjon og akkumulering av 100 μM [1-¹⁴C]oljesyre.

Differensierte myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus ble forbehandlet i 2 dager med GW 501516 med en konsentrasjon på 10^{-7} M, før de på dag 4 etter differensieringsstart ble inkubert i 4 timer med [1-¹⁴C]oljesyre, med en total oljesyrekonsentrasjon på 100 μM . Myotubenes oksidasjon av [1-¹⁴C]oljesyre ble målt som frisatt CO₂ (A) og akkumulering av [1-¹⁴C]oljesyre ble målt som celleassosiert oljesyre (CA) (B). Data illustreres som gjennomsnitt av prosent av kontroll \pm SEM. Det ble utført 6-8 forsøk per donorgruppe, med 8 paralleller per forsøk. a; $p < 0,05$ mot ubehandlet knockout, b; $p < 0,05$ mot ubehandlet villtype.

Ved en oljesyrekonsentrasjon på 600 μM , ble det også observert en tendens til effekt av behandling med GW 501516 på oljesyreoksidasjonen hos både knockout- og villtype-myotubene (figur 3.15 A). For akkumuleringen av oljesyre ble det observert en tendens til effekt av GW 501516 hos både knockout- og villtype-myotubene (figur 3.15 B). Hos villtype-myotubene ble det ved en konsentrasjon av GW 501516 på 10^{-6} M funnet en signifikant økt akkumulering av oljesyre sammenlignet med ubehandlet kontroll ($p = 0,031$, parret t-test).

Det ble ikke observert noen forskjell mellom knockout- og villtype-myotuber for verken oksidasjon eller akkumuleringen av 600 μ M oljesyre etter forbehandling med GW 501516 (figur 3.15 A og B).



Figur 3.15: Effekt av GW 501516 på oksidasjon og akkumulering av 600 μ M [1-¹⁴C]oljesyre. Differensierte myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus ble forbehandlet i 2 dager med GW 501516 med en konsentrasjon på 10⁻⁷ M, før de på dag 4 etter differensieringsstart ble inkubert i 4 timer med [1-¹⁴C]oljesyre, med en total oljesyrekonsentrasjon på 600 μ M. Myotubenes oksidasjon av [1-¹⁴C]oljesyre ble målt som frisatt CO₂ (A) og akkumulering av [1-¹⁴C]oljesyre ble målt som celleassosiert oljesyre (CA) (B). Data illustreres som gjennomsnitt av prosent av kontroll for hver donorgruppe \pm SEM. Det ble utført 6-8 forsøk per donorgruppe, med 8 paralleller per forsøk. b; $p < 0,05$ mot ubehandlet villtype.

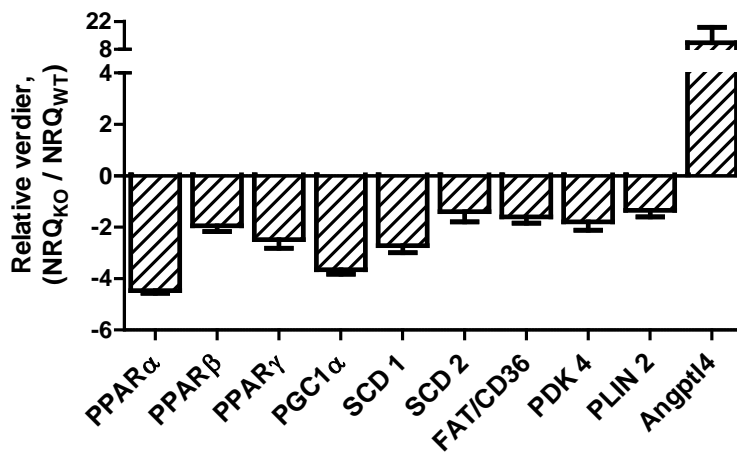
3.6 Genekspresjon

For å bekrefte validiteten av denne NCU-G1-knockout-musemodellen ble uttrykket av NCU-G1 undersøkt ved hjelp av real-time RT-PCR. Det ble funnet at NCU-G1 var mer enn 100 ganger nedregulert i knockout-myotubene sammenlignet med villtype-myotubene. Dette vil tilsa at knockout-myotubene hadde et uttrykk på mindre enn 1 % av uttrykket til villtype-myotubene ($p = 0,0004$).

3.6.1 Basal genekspresjon

På bakgrunn av de observerte tendensene til en endret energimetabolisme hos knockout-myotubene, var det av interesse å undersøke om det også forelå noen forskjeller i uttrykket av gener involvert i energimetabolismen i skjelettmuskel. For å studere dette ble mRNA-uttrykket til et utvalg gener undersøkt ved hjelp av real-time RT-PCR. De utvalgte genene spiller viktige roller i reguleringen av energimetabolismen i skjelettmuskel, blant annet opptak av FFA (FAT/CD36), lipogenese (SCD), lipidlagring (PLIN 2) og glukosemetabolisme (PDK 4) (avsnitt 1.3.1 og 1.3.2). PGC1 α har blitt vist å være involvert i mitokondriell biogenese og fibertransformasjon, fra type II- til type I-fibre [99]. Funksjonen til Angptl4 er ikke fullstendig klarlagt, men kan trolig ha en rolle i tilførselen av FFA til skjelettmuskel og kanskje også lipolyse av IMTG (avsnitt 1.3.1). For å kunne ta høyde for at eventuelle forskjeller i uttrykket av PPAR ikke skulle påvirke resultatene, ble uttrykket av selve reseptorene også undersøkt. For å undersøke dette ble differensierte myotuber på dag 4 etter differensieringsstart høstet. RNA ble isolert og cDNA syntetisert, før kvantitative målinger ble foretatt ved hjelp av real-time RT-PCR. Data ble normalisert mot et husholdningsgen, β -aktin, og deretter normalisert mot ubehandlet kontroll (formler for beregning er vist i appendiks 8).

Resultatene viste en tydelig tendens til at Angptl4 var høyere uttrykt i knockout-myotubene sammenlignet med villtype-myotubene, med en nesten 11,4 ganger økning (figur 3.16). Resultatet var ikke statistisk signifikant ($p = 0,082$). Samtlige av de andre genene som ble undersøkt utviste tendenser til å være lavere uttrykt i knockout-myotubene, sammenlignet med villtype-myotubene. Deriblant PPAR α og PGC1 α som ble vist til å være henholdsvis 4,5 og 3,7 ganger lavere uttrykt i knockout-myotubene sammenlignet med villtype-myotubene.



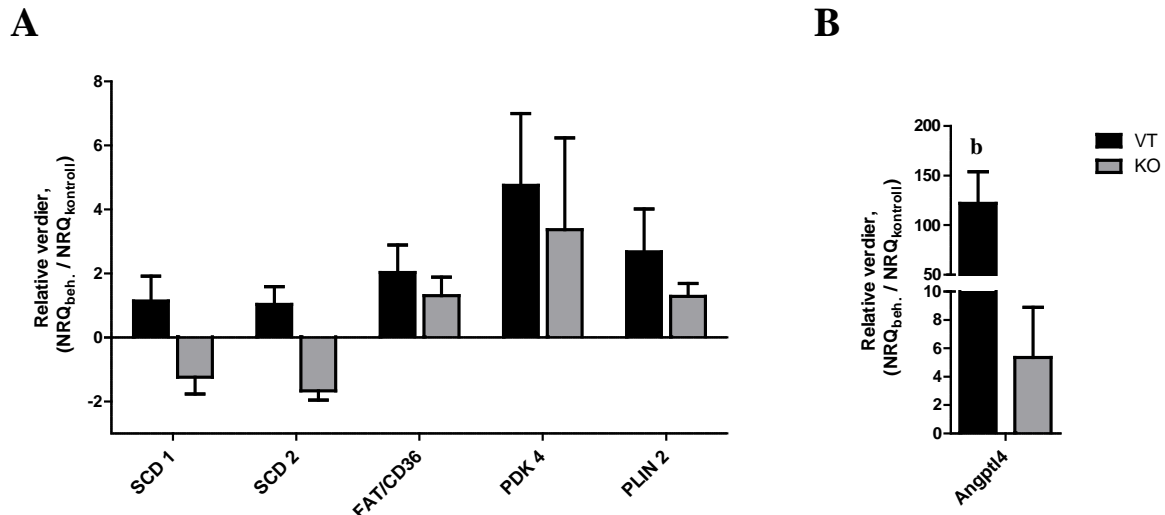
Figur 3.16: Uttrykket av et utvalg gener involvert i energimetabolismen i skjelettmuskel. Differensierte myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype mus ble på dag 4 etter differensieringsstart høstet og RNA ble isolert. cDNA ble syntetisert før en kvantitativ analyse ble utført ved hjelp av real-time RT-PCR. Data ble normalisert mot husholdningsgenet β -aktin, og deretter relatert til villtype (kontroll). Data illustreres som gjennomsnitt \pm SEM fra 3 forsøk, med 3 paralleller i hvert forsøk.

3.6.2 Effekt av PPAR α -agonist på genekspresjon

Basert på NCU-G1s mulige rolle som koaktivator for PPAR α og at denne effekten var ligandavhengig, var det ønskelig å undersøke om det var noen forskjell i uttrykket av et utvalg kjente PPAR α -målgener mellom myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus etter forbehandling med en PPAR α -agonist (GW 7647). For å undersøke dette ble myotubene behandlet med GW 7647 med en konsentrasjon på 10^{-7} M i 2 dager, før myotubene på dag 4 etter differensieringsstart ble høstet. RNA ble isolert og cDNA ble syntetisert, før kvantitative målinger ble foretatt ved hjelp av real-time RT-PCR. Data ble normalisert mot husholdningsgenet β -aktin, og deretter normalisert mot ubehandlet kontroll (formler for beregning er vist i appendiks 8).

Resultatene viste en tendens til høyere uttrykk av PDK 4 etter forbehandling med GW 7647 hos både knockout- og villtype-myotuber, med en henholdsvis 3,4 og 4,8 gangers økning (figur 3.17 A). Det ble ikke funnet noen statistisk signifikant forskjell mellom donorgruppene. Resultatene viste en tendens til at uttrykket av Angptl4 etter forbehandling med GW 7647 var høyere for villtype-myotubene med en 122,2 gangers økning, sammenlignet med knockout-myotubene med en 5,3 gangers økning (figur 3.17 B). Resultatet var ikke statistisk signifikant. Det ble funnet et statistisk signifikant høyere uttrykk av Angptl4 hos villtype-

myotubene etter behandling med GW 7647, sammenlignet med ubehandlet kontroll ($p = 0,0003$, parret t-test).



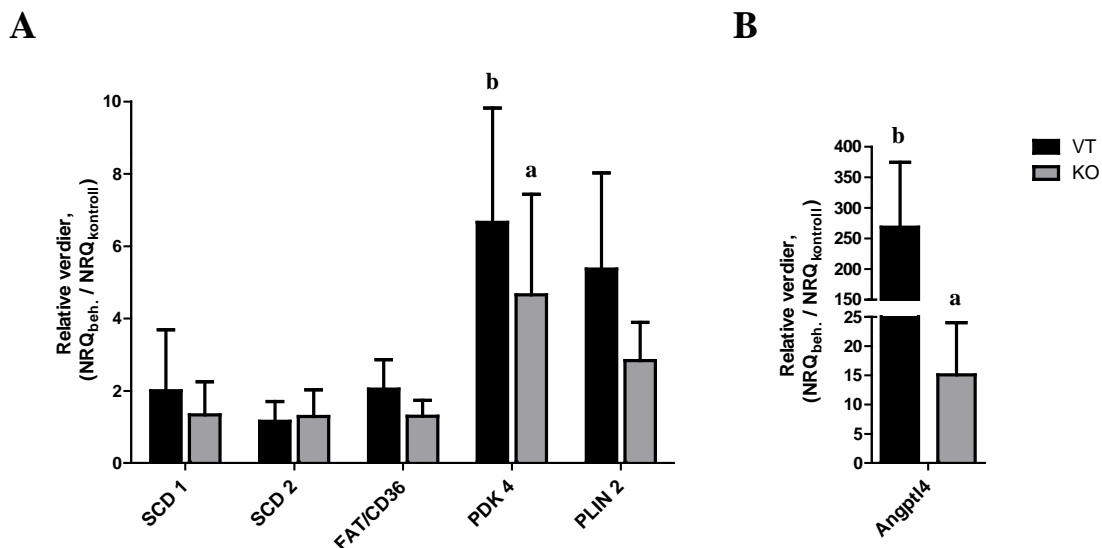
Figur 3.17: Effekt av GW 7647 på genekspresjon. Differensierte myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus ble forbehandlet i 2 dager med GW 7647 med en konsentrasjon på 10^{-7} M, før de på dag 4 etter differensieringsstart ble høstet og RNA isolert. cDNA ble syntetisert, før en kvantitativ analyse ble utført ved hjelp av real-time RT-PCR. mRNA-uttrykket til følgende gener ble undersøkt; SCD 1, SCD 2, FAT/CD36, PDK 4, PLIN 2 (A) og Angptl4 (B). Data er normalisert mot husholdningsgenet β -aktin, og deretter relatert til ubehandlet kontroll. Data illustreres som gjennomsnitt \pm SEM fra 3 forsøk, med 3 paralleller i hvert forsøk. b; $p < 0,05$ mot ubehandlet villtype.

3.6.3 Effekt av PPAR β -agonist på genekspresjon

På bakgrunn av teorien om NCU-G1s mulig rolle som koaktivator for PPAR, var det av interesse å undersøke om det var noen forskjell i ekspresjonen av et utvalg kjente PPAR β -målgener mellom myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus etter forbehandling med en PPAR β -agonist. For å undersøke dette ble myotubene behandlet med PPAR β -agonisten, GW 501516, med en konsentrasjon på 10^{-7} M i 2 dager, før myotubene på dag 4 etter differensieringsstart ble høstet. RNA ble isolert og cDNA ble syntetisert, før kvantitative målinger ble foretatt ved hjelp av real-time RT-PCR. Data ble normalisert mot husholdningsgenet β -aktin og deretter normalisert mot ubehandlet kontroll (formler for beregning er vist i appendiks 8).

Resultatene viste at forbehandling med GW 501516 ga til et statistisk signifikant høyere uttrykk av PDK 4 hos både knockout- og villtype-myotuber, sammenlignet mot deres

ubehandlede kontroller ($p = 0,043$, $p = 0,045$, parret t-test) (figur 3.18 A). Det ble observert en tendens til at effekten av GW 501516 på uttrykket av PDK 4 var lavere for knockout-myotubene sammenlignet med villtype-myotubene, hvorav det ble observert en 6,7 gangers økning hos knockout-myotubene og en 4,7 gangers økning hos villtype-myotubene, sammenlignet med ubehandlet kontroll. For uttrykket av PLIN 2 ble det observert en tendens til at forbehandling med GW 501516 økte uttrykket hos både knockout- og villtype-myotubene. Tilsvarende ble det observert en tendens til at effekten av GW 501516 på uttrykket av PLIN 2 var lavere for knockout-myotubene med en 2,8 gangers økning, sammenlignet med villtype-myotubene med en 5,4 gangers økning. Forbehandling med GW 501516 økte signifikant uttrykket av Angptl4 hos både knockout- og villtype-myotuber, sammenlignet med deres ubehandlede kontroller ($p = 0,016$, $p = 0,0001$, parret t-test). Det forelå en klar tendens til at effekten av GW 501516 på uttrykket av Angptl4 var høyere for villtype-myotubene, sammenlignet med knockout-myotubene, hvorav det for villtype-myotubene forelå en 268,6 ganger økning i uttrykket sammenlignet med ubehandlet kontroll, mot en 15,1 ganger økning hos knockout-myotubene, mot ubehandlet kontroll. Resultatet var ikke statistisk signifikant ($p = 0,11$).

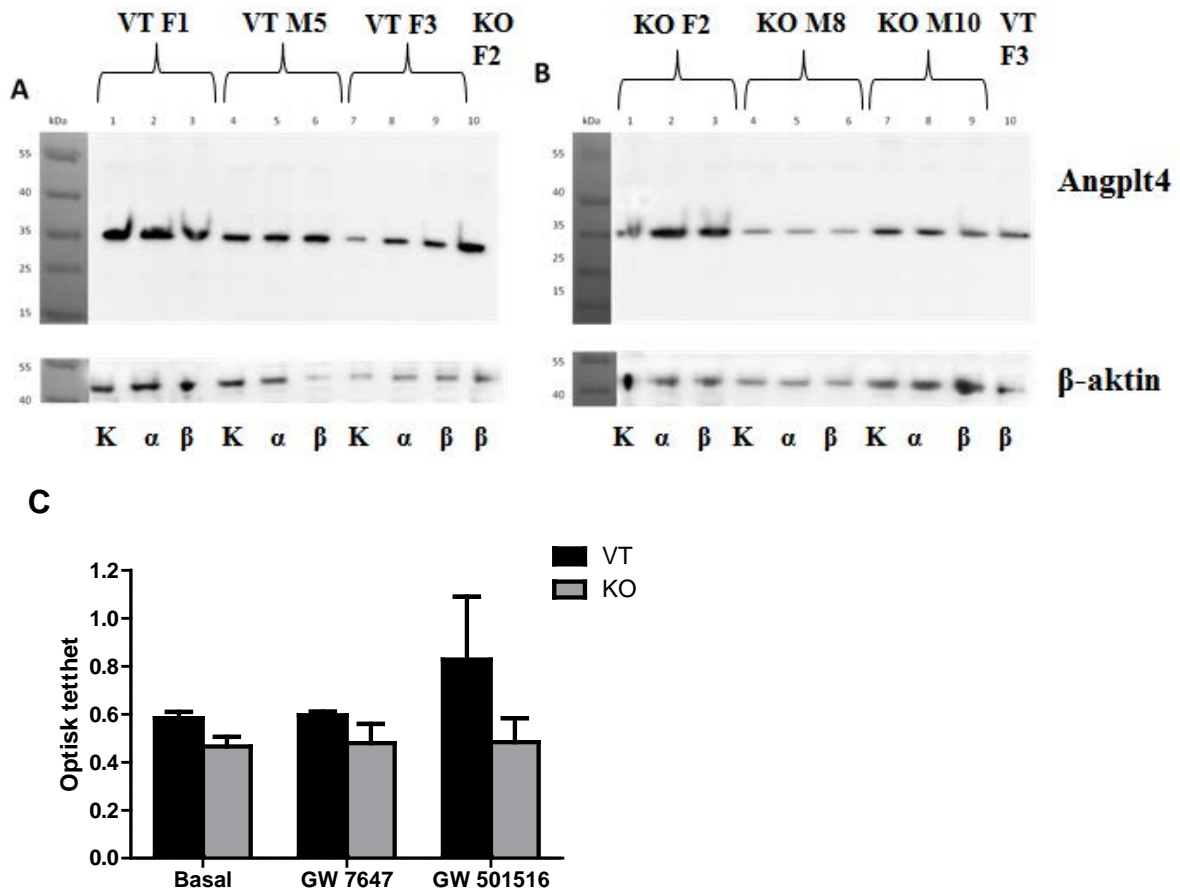


Figur 3.18: Effekt av GW 501516 på genekspressjon. Differensierte myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus ble forbehandlet i 2 dager med GW 501516 med en konsentrasjon på 10^{-7} M, før de på dag 4 etter differensieringsstart ble høstet. RNA ble isolert og cDNA syntetisert, før en kvantitativ analyse ble utført ved hjelp av real-time RT-PCR. mRNA-uttrykket til følgende gener ble undersøkt; SCD 1, SCD 2, FAT/CD36, PDK 4, PLIN 2 (A) og Angptl4 (B). Data ble normalisert mot husholdningsgenet β -aktin, og deretter relatert til ubehandlet kontroll. Data illustreres som gjennomsnitt \pm SEM fra 3 forsøk, med 3 paralleller i hvert forsøk. a; $p < 0,05$ mot ubehandlet knockout, b; $p < 0,05$ mot ubehandlet villtype.

3.7 Proteinuttrykk av Angptl4

På bakgrunn av de observerte tendensene til høyere mRNA-uttrykk av Angptl4 i knockout-myotubene sammenlignet med villtype-myotubene, var det ønskelig å undersøke om dette også gjenspeilet seg på proteinnivå, både basalt og etter stimulering med agonister. For å undersøke dette ble differensierte myotuber fra knockout- og villtype-mus forbehandlet med enten en PPAR α -agonist (GW 7647) eller en PPAR β -agonist (GW 501516). På dag 4 etter differensieringsstart ble myotubene høstet og forsøk ble utført ved hjelp av SDS-PAGE og Westernblotting. For å korrigere for eventuelle variasjoner i mengde protein applisert på gelen ble resultatene normalisert mot referanseproteinet β -aktin. Siden prøvene fra knockout- og villtype-myotuber ble applisert på ulike geler ble i tillegg en prøve fra den ene donorgruppen applisert på gelen til den andre, som en normaliseringskontroll. Proteinet Angptl4 finnes i to størrelser [100], og i denne oppgaven ble et antistoff rettet mot den minste formen, på omtrent 35 kDa, benyttet.

Figur 3.19 A viser deteksjon av Angptl4 og referanseproteinet β -aktin hos villtype-myotuber, mens figur 3.19 B viser deteksjon av Angptl4 og β -aktin hos knockout-myotuber. Det ble observert tendenser til et høyere proteinuttrykk av Angptl4 hos villtype-myotubene sammenlignet med knockout-myotubene (figur 3.19 C). Forbehandling med GW 7647 eller GW 501516 påvirket ikke proteinuttrykket av Angptl4 hos knockout-myotubene (figur 3.19 C). Hos villtype-myotubene ble det observert en tendens til at forbehandling med GW 501516 økte proteinuttrykket av Angptl4.

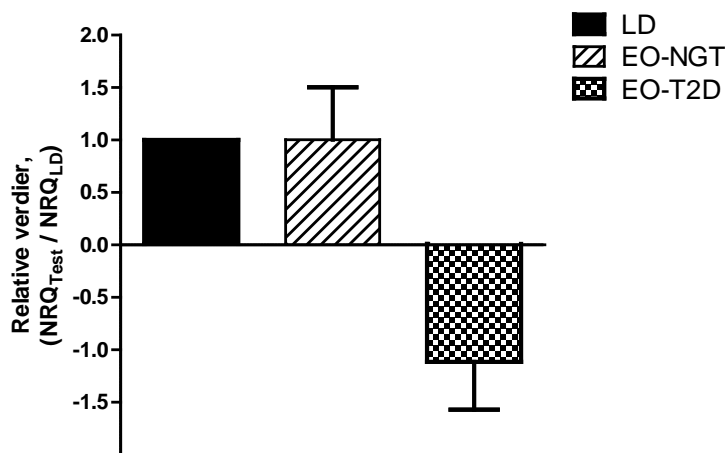


Figur 3.19: Deteksjon og kvantifisering av Anptl4 hos knockout- og villtype-myotuber. Myotubene ble forbehandlet i 2 dager med enten 10^{-7} M GW 7647 eller 10^{-7} M GW 501516, før de på dag 4 etter differensieringsstart ble høstet og forsøk utført ved hjelp av SDS-PAGE og Westernblotting. **A)** Deteksjon av Angptl4 og β -aktin hos villtype-myotuber fra ulike donorer; VT F1 (brønn 1-3), VT M5 (brønn 4-6) og VT F3 (brønn 7-9), hver med følgende rekkefølge; kontrollbehandling (K), GW 7647 (α) og GW 501516 (β). Brønn 10 er normaliseringskontroll (KO F2 behandlet med GW 501516). **B)** Deteksjon av Angptl4 og β -aktin hos knockout-myotuber fra ulike donorer; KO F2 (brønn 1-3), KO M8 (brønn 4-6) og KO M10 (brønn 7-9), hver med følgende rekkefølge; kontrollbehandling (K), GW 7647 (α), og GW 501516 (β). Brønn 10 er normaliseringskontroll (VT F3 behandlet med GW 501516). **C)** Proteinuttrykk av Angptl4 ble normalisert mot referanseproteinet β -aktin for hver donorgruppe. Data er illustrert som gjennomsnitt \pm SEM ($n = 3$).

3.8 Ekspresjon av NCU-G1 i humane myotuber

Fedme og insulinresistens har blitt foreslått som de viktigste faktorene i metabolsk syndrom. Felles for begge er teorien om at en endret fettsyremetabolisme og en resulterende akkumulering av lipider i andre vev enn fettvev er involvert i både utvikling og forverring av sykdommen (avsnitt 1.1.1 og 1.1.2). Det har blitt observert tendenser til en lavere oljesyreoksidasjon og en høyere glukoseoksidasjon hos knockout-myotubene, sammenlignet med villtype-myotubene. På bakgrunn av dette var det derfor ønskelig å undersøke om det forelå noen forskjell i uttrykket av NCU-G1 i skjelettmuskel hos normalvektige personer (LD), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige med type 2 diabetes (EO-T2D) (for donorkarakteristikk se appendiks 1.2.). For å undersøke dette ble cDNA, fra humane myotuber fra disse donorgruppene benyttet. Data ble normalisert mot husholdningsgenet HPRT og relatert til normalvektige personer (satt til 1). Formler for beregninger er vist i appendiks 8.

Resultatene viste ingen forskjell i uttrykket av NCU-G1 mellom verken ekstremt overvektige personer med normal glukosetoleranse og ekstremt overvektige med type 2-diabetes, sammenlignet normalvektige (figur 3.20).



Figur 3.20: Ekspresjon av NCU-G1 i humane myotuber. mRNA-uttrykket av NCU-G1 i humane myotuber fra normalvektige personer (LD) (kontroll), ekstremt overvektige personer med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige personer med type 2 diabetes (EO-T2D), ble undersøkt ved hjelp av real-time RT-PCR. Data ble normalisert mot husholdningsgenet HPRT, og relatert til normalvektig kontroll (satt til 1). Data illustreres som gjennomsnitt \pm SEM fra 3-4 forsøk, med 3 paralleller per forsøk.

4 Diskusjon

Det er fortsatt ukjent hvilken funksjon NCU-G1 har i cellen, men i løpet av de siste årene har flere teorier blitt foreslått. Schieweck et al. har foreslått en mulig rolle som lysosomalt membranprotein [68], mens Steffensen et al. har blant annet foreslått en mulig rolle som koaktivator for PPAR α [66]. Disse teoriene viser tydelig at forskningen kun er i startgroppen når det gjelder å avdekke NCU-G1s funksjon. For å studere NCU-G1s mulige funksjoner nærmere ble det opprettet en NCU-G1-knockout-musemodell [71]. Slike knockout-musemodeller er egnede redskaper for å studere ulike proteins funksjon (hypotesetesting), ved at konsekvensene av genets fravær kan studeres. Mus kan i tillegg benyttes som modell for human biologi, da det har blitt vist at mus og menneske deler 99 % av deres gener, i tillegg til at de også deler arvelige sykdommer [72].

4.1 Bekreftelse av validiteten til forsøksdesignet

For å kunne studere funksjonen til NCU-G1 i skjelettmuskel ble myotuber fra NCU-G1-knockout- og villtype-mus sammenlignet. For å kunne utføre dette ble satellittceller isolert fra muskel fra baklemmer til NCU-G1-knockout- og villtype-mus. Under differensiering av satellittceller til myotuber ble det raskt sett tendenser til at celler fra ulike individer oppførte seg ulikt, både med hensyn på differensieringsevne og at fibre etter differensiering varierte med hensyn på antall og lengde (figur 3.1 og 3.2). Det var ikke uventet at isolerte celler fra ulike individer ville oppføre seg ulikt. Det har til og med blitt vist at satellittceller isolert fra den samme muskelen, men også fra samme fiber, består av en heterogen populasjon som varierer med hensyn på funksjon [101].

For å bekrefte at NCU-G1 var fraværende i knockout-myotubene ble mRNA-uttrykket av NCU-G1 undersøkt ved hjelp av real-time RT-PCR. Det ble funnet at NCU-G1 var mer enn 100 ganger nedregulert i knockout-myotubene sammenlignet med villtype-myotubene. Det at det i denne oppgaven ble observert at NCU-G1 var uttrykt i myotuber fra villtype-mus er motstridende til observasjoner gjort av Schieweck et al., som ikke kunne detektere NCU-G1 i skjelettmuskel fra mus [68]. Deteksjonen av NCU-G1 på mRNA-nivå i knockout-myotubene skyldes trolig at «gen-trapen» som ble satt inn ikke er i stand til å hindre all transkripsjon av NCU-G1-genet og at små mengder mRNA allikevel blir dannet [102]. Kvantitativt sett er dette svært lite, og sannsynligvis uten funksjonell betydning. Formålet med denne oppgaven

er å undersøke hvilke konsekvenser mangelen på NCU-G1 medfører og et uttrykk på mindre enn 1 % i knockout-myotubene, relativt til villtype-myotubene, vil ikke interferere med tolkningen av disse resultatene, da denne nedreguleringen er mer enn tilstrekkelig for å kunne undersøke NCU-G1s mulige roller i skjelettmuskel.

Siden forsøk ble utført parallelt med isolering og oppskalering av cellelinjene, førte dette til at det ble utført flere forsøk på de første donorene som ble isolert og oppskalert. Disse donorene kunne dermed ha en sterkere innflytelse på resultatene. De observerte forskjellene mellom donorene med hensyn på proliferasjonshastighet og differensieringsevne ville kunne bidra til at forsøkene ble utført med et ulikt antall myotuber, som da ville kunne påvirke resultatene. For å redusere betydningen av variasjoner i antall myotuber normaliseres data mot proteinmengde, men individuelle forskjeller kan allikevel skinne gjennom. På bakgrunn av dette ble de ulike donorenes evne til å oksidere og akkumulere oljesyre undersøkt. Det var særlig myotuber fra en donor som skilte seg ut, fra knockout-donoren KO M10, ved at de hadde nesten dobbel så høy oksidasjon og akkumulering av oljesyre, sammenlignet med myotuber fra de andre knockout-donorene (tabell 3.1 og 3.2). Ved å undersøke hvor stor andel av oljesyren som ble tatt opp som ble oksidert (fraksjonell oksidasjon) ble det observert at dette lå på samme nivå som for de andre knockout-myotubene (tabell 3.3). Dette tydet på at myotubene fra KO M10 trolig hadde en høyere evne til å ta opp oljesyre og respondere til dette med å øke oksidasjonen, sammenlignet med de andre knockout-myotubene. Siden ingen klare avvik ble funnet, ble donorene for videre undersøkelser samlet i sine respektive donorgrupper.

4.2 Effekt av NCU-G1 på energimetabolismen i skjelettmuskel

Preliminære undersøkelser på knockout-musene tydet på at det forelå en endret fibertypesammensetning i skjelettmuskel. Det ble funnet tendenser til en høyere andel type IIB-fibre i *musculus extensor digitorum* (EDL)-muskel og en redusert fibertykkelse i *musculus soleus* (SOL)-muskel hos knockout-musene, sammenlignet med deres villtype-søsken [75]. De ulike fibertypene definerer hvilken energimetabolisme muskelen primært benytter seg av og har dermed stor betydning for muskelens energimetabolisme. Type IIB-fibre kjennetegnes av at de har det laveste nivået av mitokondrier og oksidative enzymer, og benytter primært glykolyse til sin ATP-produksjon [15]. På bakgrunn av disse funnene var det ønskelig å

undersøke om det forelå noen endringer i energimetabolismen i skjelettmuskel fra disse dyrene.

Resultatene presentert i denne oppgaven viste at knockout-myotubene hadde tendens til lavere oljesyreoksidasjon og høyere glukoseoksidasjon. For den laveste oljesyrekonsentrasjonen ble det funnet at knockout-myotubene oksiderte signifikant mindre av oljesyren som ble tatt opp, sammenlignet med villtype-myotubene (38 % vs. 45 %) (figur 3.3 D). Disse resultatene er noe lavere enn det som tidligere er vist hos i myotuber fra villtype-mus, med henholdsvis 68 - 75 % [80]. Disse resultatene kan ikke sammenlignes direkte siden de ble beregnet ulikt, men kan trolig indikere at villtype-myotubene benyttet i denne oppgaven har en noe lavere fraksjonell oksidasjon. Ved en høyere oljesyrekonsentrasjon ble en lignende tendens sett (35 % vs. 40 %) (figur 3.3 D). Det ble ikke observert forskjeller mellom donorgruppene i deres evne til å akkumulere oljesyre (figur 3.3 B), men for opptaket av oljesyre ble det funnet en tendens til at det var lavere hos knockout-myotubene (figur 3.3 C). Samlet kan disse resultatene tyde på at mangelen på NCU-G1 medfører en lavere oljesyreoksidasjon. Det ble i tillegg vist at substrattilgjengeligheten hadde betydning for akkumulering av oljesyre, ved at begge donorgruppene hadde signifikant høyere akkumulering av oljesyre ved den høyeste oljesyrekonsentrasjonen (figur 3.3 B). Det ble ikke observert et lineært forhold mellom oljesyrekonsentrasjonen og akkumuleringen av oljesyre, som kanskje kan tyde på at myotubenes evne til å akkumulere oljesyre kan mettes. I humane myotuber har det blitt vist at akkumuleringen av oljesyre mettes ved høye konsentrasjoner, hvor en økning fra 100 μM til 200 μM kun gav en minimal økning i akkumuleringen [84].

Ved tilsetning av glukose ble det observert tendenser til at både akkumulering, opptak og oksidasjon av glukose var høyere hos knockout-myotubene. Det ble observert at knockout-myotubene både oksiderte mer (64 %), akkumulerte mer (81 %) og tok opp mer (72 %) enn villtype-myotubene (figur 3.6 A, B og C). Dette tyder på at mangelen på NCU-G1 medfører et høyere opptak og en høyere oksidasjon av glukose. Det har blitt foreslått at NCU-G1 kan fungere som en koaktivator for PPAR α [66], og i tillegg har det blitt vist at overuttrykk av PPAR α hos mus førte til et redusert opptak av glukose i skjelettmuskel og insulinresistens [54]. På bakgrunn av dette og de observerte tendensene i denne oppgaven kan det, under den forutsetningen av det var nok endogen ligand for PPAR α til stede, spekuleres om at NCU-G1 kan ha betydning for effekter av PPAR α på opptaket av glukose. Siden resultatene viste tendenser til at glukoseopptaket var høyere da NCU-G1 var fraværende, kan det spekuleres i

om NCU-G1 kan ha en mulig rolle som koaktivator for PPAR α i dens regulering av glukoseopptak. Det kunne derfor ha vært interessant å undersøke effekten av en PPAR α -agonist på opptaket glukose.

Undersøkelser på myotubenes reservekapasitet for oksidasjon av oljesyre og glukose viste tendenser til at knockout-myotubene benyttet seg mer av sin reservekapasitet for oksidasjon av både oljesyre og glukose under normale forhold, men på grunn av høy spredning i resultatene er det vanskelig å si noe sikkert (figur 3.5 B og 3.8 B). Undersøkelser på gen-nivå viste at både PPAR og flere av deres målgener var nedregulert hos knockout-myotubene, deriblant koaktivatoren PGC1 α , som blant annet har blitt vist til å være involvert i mitokondriell biogenese [99]. På bakgrunn av disse observasjonene kan det spekuleres i om at mangelen på NCU-G1 medfører et lavere antall oksidative enzymer og/eller et lavere antall mitokondrier.

På bakgrunn av de observerte tendensene til en lavere oljesyreoksidasjon og en høyere glukoseoksidasjon hos knockout-myotubene, var det interessant å undersøke myotubenes substratpreferanse. Ved å tilføre myotubene oljesyre og glukose samtidig ble det observert en tendens til at knockout-myotubene hadde en høyere totaloksidasjon (figur 3.9 A). Det ble i tillegg vist at knockout-myotubene hadde en signifikant høyere maksimal totaloksidasjonskapasitet, og det var en tydelig tendens til at dette kunne tilskrives en høyere maksimal oksidasjonskapasitet for glukose, som var omtrent 80 % høyere for knockout-myotubene (figur 3.9 B). Knockout-myotubene ble også vist til å ha en signifikant større reservekapasitet for totaloksidasjon og at dette skyldtes en signifikant høyere reservekapasitet for oksidasjon av glukose, som var mer enn dobbelt så høy for knockout-myotubene (figur 3.9 C). Dette kan tyde på at knockout-myotubene både foretrekker og primært bruker glukose som energisubstrat, og dermed trolig er mer glykolytiske enn villtype-myotubene. Det er kjent at satellittceller fra mus beholder fiberkarakteristikkene til muskelen de ble isolert fra *in vitro* [103]. Med tanke på de preliminare funnene om at det foreligger et høyere nivå av de glykolytiske type IIB-fibre i EDL-muskel hos knockout-musene [75], kan det spekuleres i om muskelvevet, fra hvor satellittcellene ble isolert, også utviste en høyere andel type IIB-fibre, og at denne egenskapen ble overført *in vitro*.

Videre ble betydningen av mangelen på NCU-G1 på uttrykket av et utvalg gener involvert i energimetabolismen i skjelettmuskel undersøkt. De utvalgte genene spiller viktige roller i blant annet opptak av FFA (FAT/CD36), lipogenese (SCD), lipidlagring (PLIN 2),

glukosemetabolisme (PDK 4), mitokondriell biogenese og fibertransformasjon (PGC1 α) [9, 20, 34, 37, 99]. Funksjonen til Angptl4 er ikke klarlagt, men har blitt foreslått til å ha en rolle i tilførselen av FFA til skjelettmuskel og kanskje også lipolyse av IMTG [30, 31]. For å ta høyde for eventuelle forskjeller i uttrykket av PPAR-isoformene ble også uttrykket av selve reseptorene undersøkt.

Resultatene presentert i denne oppgaven viste en tendens til at uttrykket av samtlige gener var lavere i knockout-myotubene sammenlignet med villtype-myotubene, med unntak av Angptl4 (figur 3.16). For Angptl4 ble det observert en tendens til 11 ganger høyere uttrykk i knockout-myotubene sammenlignet med villtype-myotubene (figur 3.16). Dette kan kanskje tyde på at NCU-G1 har en hemmende effekt på mRNA-uttrykket av Angptl4, da fravær av NCU-G1 resulterte i et økt uttrykk. I midlertidig trenger ikke et høyt uttrykt på mRNA-nivå indikere at proteinuttrykket er tilsvarende økt, da dette kun reflekterer transkripsjonshastigheten av genet og halveringstiden til mRNAet, og trenger ikke være tett forbundet med translasjonseffektiviteten og proteinets halveringstid [31, 104]. På proteinnivå ble det ikke observert at Angptl4 var høyere uttrykt i knockout-myotubene (figur 3.19 C). Det kan likevel ikke utelukkes at Angptl4 er høyere uttrykt på proteinnivå, da Angptl4 finnes på to former [100], hvorav i denne oppgaven kun den miste formen ble detektert og kvantifisert.

Det ble observert tendenser til at både PPAR α , PPAR β og PGC1 α var lavere uttrykt i knockout-myotubene, med 2 - 5 gangers nedregulering (figur 3.16). Dette kan kanskje støtte spekulasjonene om at det er en høyere andel type IIb-fibre i knockout-myotubene, da det hos mennesker har blitt vist at det er et lavere uttrykk av PPAR α , PPAR β og PGC1 α hos personer med en høy andel type IIb-fibre [58]. Det ble også observert tendenser til et lavere uttrykk av fettsyretransportøren FAT/CD36 hos knockout-myotubene, og det kan spekuleres om at knockout-myotubene har lavere evne til å ta opp FFA, da FAT/CD36 trolig er den viktigste fettsyretransportøren i skjelettmuskel [9]. I tillegg har Bonen et al. har foreslått en mulig sammenheng mellom uttrykket av FAT/CD36 og kapasitet for fettsyreoksidasjon [105]. Disse spekulasjonene kan støttes av at det ble observert tendenser til lavere oksidasjon og opptak av oljesyre hos knockout-myotubene (figur 3.3 A og C). Det har i tillegg blitt vist at det foreligger et lavere uttrykk av FAT/CD36 i oksidativ muskel [106]. Samlet ser det ut til at mangel på NCU-G1 medfører et lavere uttrykk av viktige gener i energimetabolismen i skjelettmuskel, som kan føre til en reduksjon i muskelens evne til ta opp og oksidere fettsyrer.

Det foreligger et dynamisk samspill mellom glukose og fettsyrer i energimetabolismen i skjelettmuskel. Det har blitt vist at oksidasjon av fettsyrer kan hemme både opptak og oksidasjon av glukose, via en mekanisme kalt «Randle»-syklus [39]. I tillegg har det motsatte også blitt vist, en «Reverse Randle»-syklus, hvor høye nivåer av glukose hemmer fettsyreoksidasjonen [40]. For å undersøke metabolsk fleksibilitet *in vitro* kan blant annet begrepet suppressibilitet benyttes. Suppressibilitet er evnen cellene har til å undertrykke fettsyreoksidasjonen i respons til tilsetning av glukose [44]. I denne oppgaven ble det observert tendenser til at glukose undertrykket oksidasjonen av oljesyre, men en høy spredning på resultatene gjør at det er vanskelig å si noe sikkert (figur 3.10). På mRNA-nivå ble det observert en tendens til et lavere uttrykk av PDK 4 hos knockout-myotubene sammenlignet med villtype-myotubene, med en nesten 2 gangers nedregulering (figur 3.16). PDK 4 er en viktig komponent involvert i skiftet mellom glukose- og fettsyreoksidasjon i skjelettmuskel [20], og det kan spekuleres i om et lavere uttrykk av PDK 4 hos knockout-myotubene kan kanskje indikere økt glukoseoksidasjon hos knockout-myotubene.

4.3 Effekt av NCU-G1 på effekt av PPAR-agonister

Steffensen et al. har foreslått en mulig rolle for NCU-G1 som koaktivator for PPAR α . Det ble vist at et samtidig uttrykk av hNCU-G1 og PPAR α førte økt transkripsjon fra en promotor inneholdende et PPRE fra et kjent PPAR α -målgen, og det ble vist at denne effekten også var ligandavhengig [66]. Siden PPRE ikke nødvendigvis er selektive for de ulike isoformene av PPAR [48], kan det ikke utelukkes at NCU-G1 kan ha effekter på andre isoformer i PPAR-familien. Preliminære undersøkelser på NCU-G1-knockout-musene viste også at en rekke PPAR-regulerte signalveier var nedregulert i nyrene hos disse dyrene [74]. Siden reseptorene i PPAR-familien spiller viktige roller i energimetabolismen i skjelettmuskel [20, 47], var det av interesse å undersøke betydningen av NCU-G1 for effekten av PPAR-agonister på oksidasjon og akkumulering av oljesyre. For å undersøke dette ble myotuber fra knockout- og villtype-mus forbehandlet i to dager med enten en PPAR α -agonist (GW 7647) eller en PPAR β -agonist (GW 501516). Studier på myotuber fra mus har vist at GW 501516 fører til en økt fettsyreoksidasjon og oppregulering av en rekke gener involvert i energimetabolismen i skjelettmuskel [51, 56]. Mindre er kjent om effekter av GW 7647 på muskel fra mus, men studier på myotuber fra både rotter og mennesker har vist at GW 7647 fører til en økt

fettsyreoksidasjon og et økt uttrykk av en rekke gener involvert i energimetabolismen i skjelettmuskel [52].

Resultatene presentert i denne oppgaven viste at forbehandling med både PPAR α - og PPAR β -agonist økte oljesyreoksidasjonen hos begge donorgruppene, med en tendens til at responsen var høyest ved den laveste oljesyrekonsentrasjonen (figur 3.12 - 3.15). For PPAR α -agonisten ble det ikke observert forskjeller mellom donorgruppene (figur 3.12 – 3.13). For PPAR β -agonisten derimot ble det observert en signifikant høyere PPAR β -indusert oljesyreoksidasjon hos knockout-mytubene ved den laveste oljesyrekonsentrasjonen (figur 3.14 A). Med utgangspunkt i teorien om at NCU-G1 er en mulig koaktivator for PPAR, hadde det vært forventet å se en lavere oljesyreoksidasjon hos knockout-mytubene, men dette ble ikke observert for noen av agonistene. For PPAR α -agonisten ble det ikke observert noen forskjell mellom donorgruppene, og en mulig teori for dette kan være at det foreligger et overskudd av koaktivatorer, slik at mangelen på NCU-G1 ikke påvirket effekten av PPAR α -agonisten på oljesyreoksidasjonen. Noe lignende har blitt foreslått i en studie på mus med knockout av koaktivatoren steroidreseptor koaktivator-1 (SRC-1), hvor det ikke ble funnet forskjeller mellom SRC-1-knockout- og villtype-mus i deres respons til en PPAR α -agonist på oksidasjon av palmitat i lever [107]. Derimot ble det i denne oppgaven observert at knockout-mytubene hadde høyere PPAR β -indusert oljesyreoksidasjon sammenlignet med villtype-mytubene. Dette kan tyde på at NCU-G1 hemmer effekten av en PPAR β -agonist på fettsyreoksidasjon, og kanskje kan ha en potensiell rolle som korepressor for denne effekten til PPAR β . På bakgrunn av at det på mRNA-nivå ble observert tendenser til at uttrykket av selve reseptorene, både PPAR α og PPAR β , var 2-4 ganger nedregulert sammenlignet med villtype-mytubene (figur 3.16), skulle det også antas at det ville forekomme en lavere agonist-indusert oljesyreoksidasjon hos knockout-mytubene. Dette kan kanskje tyde på at det foreligger reseptorreserve for både PPAR α og PPAR β , det vil si at maksimal effekt kan skje med færre enn 100 % av reseptorene bundet [108]. Imidlertid, som nevnt tidligere, trenger ikke en nedregulering på mRNA-nivå nødvendigvis reflekterer selve proteinuttrykket av reseptoren [104].

Videre undersøkelser på gen-nivå viste tendenser til at forbehandling med enten PPAR α - eller PPAR β -agonist i 2 dager økte uttrykket av Angptl4, PDK 4, PLIN 2 og FAT/CD36 hos begge donorgruppene (figur 3.17 og 3.18). Dette samsvarer med funn gjort av Dressel et al., som viste at forbehandling av myotuber fra villtype-mus med GW 501516 økte uttrykket av både

PDK 4 og PLIN 2 relativt til ubehandlet kontroll [51]. Mindre er kjent om effekten av GW 7647 på myotuber fra mus, men studier på humane myotuber har vist at forbehandling med GW 7647 i to dager økte uttrykket av PDK 4 relativt til ubehandlet kontroll [52]. I denne oppgaven ble det observert at uttrykket av Angptl4 ble økt etter forbehandling med begge agonistene hos både knockout- og villtype-myotubene. For PPAR α -agonisten ble det observert en mer enn 100 gangers oppregulering hos villtype-myotubene, mot en 5 gangers oppregulering hos knockout-myotubene (figur 3.17 B). For PPAR β -agonisten ble en lignende tendens observert, med mer enn 250 gangers oppregulering hos villtype-myotubene i motsetning til en 15 gangers oppregulering hos knockout-myotubene (figur 3.18 B). Selv om det tas hensyn til det faktum at Angptl4 i utgangspunktet var høyere uttrykt i knockout-myotubene sammenlignet med villtype-myotubene, ses det fortsatt en tendens til at forbehandling med både PPAR α - og PPAR β -agonist gav høyere respons hos villtype-myotubene. Tilsvarende, ved å ta høyde for at det i utgangspunktet var et lavere uttrykk av FAT/CD36, PDK 4, PLIN 2 i knockout-myotubene, ble det allikevel observert tendenser til at begge agonistene gav høyest respons hos villtype-myotubene (figur 3.17 A og 3.18 A). Dette kan kanskje tyde på at NCU-G1 kan ha en potensiell rolle som koaktivator for både PPAR α og PPAR β i reguleringen av uttrykket av disse genene på mRNA-nivå.

Samlet viser resultatene presentert i denne oppgaven at NCU-G1 viser koregulatoriske egenskaper for uttrykket av en rekke målgener for PPAR. Det kan se ut til at funksjonen til NCU-G1 utviser en viss grad av selektivitet mot hvilke gener som påvirkes. Steffensen et al. viste at hNCU-G1 ikke interagerer direkte med promotoren, og dermed trolig er en sekundær koaktivator [66]. Sekundære koaktivatorer trenger tilstedeværelse av andre proteiner for å kunne utøve sin virkning [46], og det kan spekuleres i om at det er disse proteinene som avgjør om NCU-G1 utviser en koregulerende effekt eller ikke. Dette er ikke utenkelig, da det for koregulatoren reseptorinteragerende protein 140 (RIP 140) har blitt vist at den kan fungere som både koaktivator og korepressor, avhengig av hvilke andre proteiner den interagerer med [109]. I lever har RIP 140 blitt vist å interagere med lever-X-reseptoren både som koaktivator og korepressor avhengig av hvilke gener som reguleres [110].

4.4 Uttrykk av NCU-G1 i humane myotuber

Resultatene presentert i denne oppgaven tyder på at mangelen på NCU-G1 kanskje kan medføre endringer i energimetabolismen i skjelettmuskel. Fedme og insulinresistens har blitt foreslått som de viktigste faktorene i metabolsk syndrom [1, 2]. Felles for begge er teorien om at en endret fettsyremetabolisme og en resulterende lipidakkumulering i blant annet skjelettmuskel, er involvert i både utvikling og forverring av sykdommen [6, 9, 10]. På bakgrunn av dette var det ønskelig å undersøke uttrykket av NCU-G1 i skjelettmuskel hos normalvektige personer (LD), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige med type 2 diabetes (EO-T2D). For å undersøke dette ble mRNA-uttrykket av NCU-G1 i myotuber fra 3-4 donorer fra hver donorgruppe undersøkt ved hjelp av real-time RT-PCR. Resultatene vist i denne oppgaven tyder ikke på at det foreligger noen forskjell i uttrykket av NCU-G1 i skjelettmuskel hos de utvalgte donorgruppene (figur 3.20).

5 Konklusjon

NCU-G1s funksjon er fortsatt ukjent, men resultatene presentert i denne oppgaven kan indikere en mulig rolle for NCU-G1 i energimetabolismen i skjelettmuskel. Det ble vist at NCU-G1 var uttrykt i myotuber fra villtype-mus og det ble observert tendenser til at myotuber fra NCU-G1-knockout-mus hadde lavere oljesyreoksidasjon og høyere glukoseoksidasjon. I tillegg ble det hos knockout-myotubene funnet en høyere maksimal totaloksidasjonskapasitet og høyere total reservekapasitet som følge av en høyere oksidasjonskapasitet for glukose.

Steffensen et al. har foreslått en mulig rolle for NCU-G1 som koaktivator for PPAR α . I denne oppgaven ble det observert at NCU-G1 påvirket noen PPAR-regulerte funksjoner og gener, men ikke alle. Dette kan trolig indikere at NCU-G1 er en koregulator for PPAR, men at den utviser en viss grad av selektivitet mot hvilke gener og funksjoner som påvirkes.

Forskningen på NCU-G1 er kun i startgroen, men resultatene presentert i denne oppgaven gir en indikasjon om at det kan være interessant å fortsette å utforske NCU-G1s rolle i energimetabolismen i skjelettmuskel. Videre fremover hadde det vært gunstig med flere donorer og et høyere antall forsøk, for å avklare om tendensene observert i denne oppgaven kan gi opphav til flere signifikante forskjeller. Det hadde også vært interessant å undersøke effekter av PPAR-agonister på oksidasjon og opptak av glukose, og effekter av insulin på glukoseopptaket. På bakgrunn av de preliminare funnene om en tendens til en høyere andel av de glykolytiske type IIb-fibre i NCU-G1-knockout-musene og observasjonene gjort i denne oppgaven hadde det vært interessant å undersøke uttrykket av genmarkører for fibertyper *in vitro*, som isoformene av «Myosin heavy chain» (MHC).

Litteraturliste

1. Grundy, S.M., Brewer, H.B., Jr., Cleeman, J.I., Smith, S.C., Jr., and Lenfant, C., *Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition*. Circulation, 2004. **109**(3): p. 433-8.
2. Grundy, S.M., *Drug therapy of the metabolic syndrome: minimizing the emerging crisis in polypharmacy*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(4): p. 295-309.
3. Eckel, R.H., Alberti, K.G., Grundy, S.M., and Zimmet, P.Z., *The metabolic syndrome*. Lancet, 2010. **375**(9710): p. 181-3.
4. World Health Organization. *Obesity and overweight*. 2011 19.04.2012]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
5. Muoio, D.M. and Newgard, C.B., *Obesity-related derangements in metabolic regulation*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 367-401.
6. Kusunoki, J., Kanatani, A., and Moller, D.E., *Modulation of fatty acid metabolism as a potential approach to the treatment of obesity and the metabolic syndrome*. Endocrine, 2006. **29**(1): p. 91-100.
7. Khan, A.H. and Pessin, J.E., *Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways*. Diabetologia, 2002. **45**(11): p. 1475-83.
8. Saltiel, A.R. and Kahn, C.R., *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
9. Zhang, L., Keung, W., Samokhvalov, V., Wang, W., and Lopaschuk, G.D., *Role of fatty acid uptake and fatty acid beta-oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1801**(1): p. 1-22.
10. Kraegen, E.W., Cooney, G.J., and Turner, N., *Muscle insulin resistance: a case of fat overconsumption, not mitochondrial dysfunction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(22): p. 7627-8.
11. Abdul-Ghani, M.A. and DeFronzo, R.A., *Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 476279.
12. Claudi, T., Abrahamsen, R., Andersen, S., Birkeland, K., Cooper, J.G., Furuseth, K.F., Hanssen, K.F., Hausken, M.F., Jørgensen, K.D., Lorentsen, N., Midthjell, K., and Næbb, H., *Nasjonale faglige retningslinjer, Diabetes, Forebygging, diagnostikk og behandling*, Helsedirektoratet, Editor 2009: Oslo.
13. Cefalu, W.T., *Pharmacotherapy for the treatment of patients with type 2 diabetes mellitus: rationale and specific agents*. Clin Pharmacol Ther, 2007. **81**(5): p. 636-49.
14. Ten Broek, R.W., Grefte, S., and Von den Hoff, J.W., *Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration*. J Cell Physiol, 2010. **224**(1): p. 7-16.
15. Sand, O., Sjaastad, Ø.V., Haug, E., and Toverud, K.C., *Menneskets fysiologi*. 1 ed. Vol. 4. 2007, Oslo: Gyldendal Norsk Forlag.
16. Harridge, S.D., *Plasticity of human skeletal muscle: gene expression to in vivo function*. Exp Physiol, 2007. **92**(5): p. 783-97.
17. Wang, Y.X., Zhang, C.L., Yu, R.T., Cho, H.K., Nelson, M.C., Bayuga-Ocampo, C.R., Ham, J., Kang, H., and Evans, R.M., *Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta*. PLoS Biol, 2004. **2**(10): p. e294.
18. Hickey, M.S., Carey, J.O., Azevedo, J.L., Houmard, J.A., Pories, W.J., Israel, R.G., and Dohm, G.L., *Skeletal muscle fiber composition is related to adiposity and in vitro glucose transport rate in humans*. Am J Physiol, 1995. **268**(3 Pt 1): p. E453-7.

19. Tanner, C.J., Barakat, H.A., Dohm, G.L., Pories, W.J., MacDonald, K.G., Cunningham, P.R., Swanson, M.S., and Houmard, J.A., *Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **282**(6): p. E1191-6.
20. Ehrenborg, E. and Krook, A., *Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor delta*. Pharmacol Rev, 2009. **61**(3): p. 373-93.
21. Stahl, A., Gimeno, R.E., Tartaglia, L.A., and Lodish, H.F., *Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family*. Trends Endocrinol Metab, 2001. **12**(6): p. 266-73.
22. Koonen, D.P., Glatz, J.F., Bonen, A., and Luiken, J.J., *Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1736**(3): p. 163-80.
23. Luiken, J.J., Schaap, F.G., van Nieuwenhoven, F.A., van der Vusse, G.J., Bonen, A., and Glatz, J.F., *Cellular fatty acid transport in heart and skeletal muscle as facilitated by proteins*. Lipids, 1999. **34 Suppl**: p. S169-75.
24. Bonen, A., Luiken, J.J., Arumugam, Y., Glatz, J.F., and Tandon, N.N., *Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14501-8.
25. Luiken, J.J., Dyck, D.J., Han, X.X., Tandon, N.N., Arumugam, Y., Glatz, J.F., and Bonen, A., *Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **282**(2): p. E491-5.
26. Aas, V., Rokling-Andersen, M., Wensaas, A.J., Thoresen, G.H., Kase, E.T., and Rustan, A.C., *Lipid metabolism in human skeletal muscle cells: effects of palmitate and chronic hyperglycaemia*. Acta Physiol Scand, 2005. **183**(1): p. 31-41.
27. Woldseth, B. and Rootwelt, T., *[Mitochondrial beta-oxidation defects]*. Tidsskr Nor Laegeforen, 2006. **126**(6): p. 756-9.
28. Kiens, B., Alsted, T.J., and Jeppesen, J., *Factors regulating fat oxidation in human skeletal muscle*. Obes Rev, 2011. **12**(10): p. 852-8.
29. Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P., *essential cell biology*. 2nd edition ed2004, United States of America: Garland Science.
30. Lichtenstein, L. and Kersten, S., *Modulation of plasma TG lipolysis by Angiopoietin-like proteins and GPIHBP1*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1801**(4): p. 415-20.
31. Staiger, H., Haas, C., Machann, J., Werner, R., Weisser, M., Schick, F., Machicao, F., Stefan, N., Fritsche, A., and Haring, H.U., *Muscle-derived angiopoietin-like protein 4 is induced by fatty acids via peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-delta and is of metabolic relevance in humans*. Diabetes, 2009. **58**(3): p. 579-89.
32. Shi, Y. and Cheng, D., *Beyond triglyceride synthesis: the dynamic functional roles of MGAT and DGAT enzymes in energy metabolism*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **297**(1): p. E10-8.
33. Paton, C.M. and Ntambi, J.M., *Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **297**(1): p. E28-37.
34. Popeijus, H.E., Saris, W.H., and Mensink, R.P., *Role of stearoyl-CoA desaturases in obesity and the metabolic syndrome*. Int J Obes (Lond), 2008. **32**(7): p. 1076-82.
35. Martin, S. and Parton, R.G., *Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(5): p. 373-8.
36. Bickel, P.E., Tansey, J.T., and Welte, M.A., *PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(6): p. 419-40.

37. Phillips, S.A., Choe, C.C., Ciaraldi, T.P., Greenberg, A.S., Kong, A.P., Baxi, S.C., Christiansen, L., Mudaliar, S.R., and Henry, R.R., *Adipocyte differentiation-related protein in human skeletal muscle: relationship to insulin sensitivity*. *Obes Res*, 2005. **13**(8): p. 1321-9.
38. Saltiel, A.R., *New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes*. *Cell*, 2001. **104**(4): p. 517-29.
39. Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N., and Newsholme, E.A., *The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus*. *Lancet*, 1963. **1**(7285): p. 785-9.
40. Sidossis, L.S. and Wolfe, R.R., *Glucose and insulin-induced inhibition of fatty acid oxidation: the glucose-fatty acid cycle reversed*. *Am J Physiol*, 1996. **270**(4 Pt 1): p. E733-8.
41. Kelley, D.E., *Skeletal muscle fat oxidation: timing and flexibility are everything*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(7): p. 1699-702.
42. Kelley, D.E. and Mandarino, L.J., *Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination*. *Diabetes*, 2000. **49**(5): p. 677-83.
43. Thoresen, G.H., Hessvik, N.P., Bakke, S.S., Aas, V., and Rustan, A.C., *Metabolic switching of human skeletal muscle cells in vitro*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2011. **85**(5): p. 227-34.
44. Ukropcova, B., McNeil, M., Sereda, O., de Jonge, L., Xie, H., Bray, G.A., and Smith, S.R., *Dynamic changes in fat oxidation in human primary myocytes mirror metabolic characteristics of the donor*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(7): p. 1934-41.
45. Yessoufou, A. and Wahli, W., *Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels*. *Swiss Med Wkly*, 2010. **140**: p. w13071.
46. Yu, S. and Reddy, J.K., *Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1771**(8): p. 936-51.
47. Gilde, A.J. and Van Bilsen, M., *Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARS): regulators of gene expression in heart and skeletal muscle*. *Acta Physiol Scand*, 2003. **178**(4): p. 425-34.
48. Lemay, D.G. and Hwang, D.H., *Genome-wide identification of peroxisome proliferator response elements using integrated computational genomics*. *J Lipid Res*, 2006. **47**(7): p. 1583-7.
49. Burri, L., Thoresen, G.H., and Berge, R.K., *The Role of PPARalpha Activation in Liver and Muscle*. *PPAR Res*, 2010. **2010**.
50. Wolf, G., *Tissue-specific knockout defines peroxisome proliferator-activated receptor gamma function in muscle and liver*. *Nutr Rev*, 2004. **62**(6 Pt 1): p. 253-5.
51. Dressel, U., Allen, T.L., Pippal, J.B., Rohde, P.R., Lau, P., and Muscat, G.E., *The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells*. *Mol Endocrinol*, 2003. **17**(12): p. 2477-93.
52. Muoio, D.M., Way, J.M., Tanner, C.J., Winegar, D.A., Kliewer, S.A., Houmard, J.A., Kraus, W.E., and Dohm, G.L., *Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha regulates fatty acid utilization in primary human skeletal muscle cells*. *Diabetes*, 2002. **51**(4): p. 901-9.
53. Muoio, D.M., MacLean, P.S., Lang, D.B., Li, S., Houmard, J.A., Way, J.M., Winegar, D.A., Corton, J.C., Dohm, G.L., and Kraus, W.E., *Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha knock-out mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR delta*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(29): p. 26089-97.

54. Finck, B.N., Bernal-Mizrachi, C., Han, D.H., Coleman, T., Sambandam, N., LaRiviere, L.L., Holloszy, J.O., Semenkovich, C.F., and Kelly, D.P., *A potential link between muscle peroxisome proliferator-activated receptor-alpha signaling and obesity-related diabetes*. Cell Metab, 2005. **1**(2): p. 133-44.
55. Jove, M., Salla, J., Planavila, A., Cabrero, A., Michalik, L., Wahli, W., Laguna, J.C., and Vazquez-Carrera, M., *Impaired expression of NADH dehydrogenase subunit 1 and PPARgamma coactivator-1 in skeletal muscle of ZDF rats: restoration by troglitazone*. J Lipid Res, 2004. **45**(1): p. 113-23.
56. Tanaka, T., Yamamoto, J., Iwasaki, S., Asaba, H., Hamura, H., Ikeda, Y., Watanabe, M., Magoori, K., Ioka, R.X., Tachibana, K., Watanabe, Y., Uchiyama, Y., Sumi, K., Iguchi, H., Ito, S., Doi, T., Hamakubo, T., Naito, M., Auwerx, J., Yanagisawa, M., Kodama, T., and Sakai, J., *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(26): p. 15924-9.
57. Luquet, S., Lopez-Soriano, J., Holst, D., Fredenrich, A., Melki, J., Rassoulzadegan, M., and Grimaldi, P.A., *Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability*. FASEB J, 2003. **17**(15): p. 2299-301.
58. Kramer, D.K., Ahlsen, M., Norrbom, J., Jansson, E., Hjeltne, N., Gustafsson, T., and Krook, A., *Human skeletal muscle fibre type variations correlate with PPAR alpha, PPAR delta and PGC-1 alpha mRNA*. Acta Physiol (Oxf), 2006. **188**(3-4): p. 207-16.
59. Norris, A.W., Chen, L., Fisher, S.J., Szanto, I., Ristow, M., Jozsi, A.C., Hirshman, M.F., Rosen, E.D., Goodyear, L.J., Gonzalez, F.J., Spiegelman, B.M., and Kahn, C.R., *Muscle-specific PPARgamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones*. J Clin Invest, 2003. **112**(4): p. 608-18.
60. Ristow, M., Muller-Wieland, D., Pfeiffer, A., Krone, W., and Kahn, C.R., *Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation*. N Engl J Med, 1998. **339**(14): p. 953-9.
61. Kramer, D., Shapiro, R., Adler, A., Bush, E., and Rondinone, C.M., *Insulin-sensitizing effect of rosiglitazone (BRL-49653) by regulation of glucose transporters in muscle and fat of Zucker rats*. Metabolism, 2001. **50**(11): p. 1294-300.
62. Hexeberg, S. and Retterstol, K., *[Hypertriglyceridemia--diagnostics, risk and treatment]*. Tidsskr Nor Laegeforen, 2004. **124**(21): p. 2746-9.
63. Argmann, C.A., Cock, T.A., and Auwerx, J., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: the more the merrier?* Eur J Clin Invest, 2005. **35**(2): p. 82-92; discussion 80.
64. Eskild, W., Simard, J., Hansson, V., and Guerin, S.L., *Binding of a member of the NF1 family of transcription factors to two distinct cis-acting elements in the promoter and 5'-flanking region of the human cellular retinol binding protein 1 gene*. Mol Endocrinol, 1994. **8**(6): p. 732-45.
65. Leclerc, S., Eskild, W., and Guerin, S.L., *The rat growth hormone and human cellular retinol binding protein 1 genes share homologous NF1-like binding sites that exert either positive or negative influences on gene expression in vitro*. DNA Cell Biol, 1997. **16**(8): p. 951-67.
66. Steffensen, K.R., Bouzga, M., Skjeldal, F., Kasi, C., Karahasan, A., Matre, V., Bakke, O., Guerin, S., and Eskild, W., *Human NCU-G1 can function as a transcription factor and as a nuclear receptor co-activator*. BMC Mol Biol, 2007. **8**: p. 106.
67. Kawamura, T., Kuroda, N., Kimura, Y., Lazoura, E., Okada, N., and Okada, H., *cDNA of a novel mRNA expressed predominantly in mouse kidney*. Biochem Genet, 2001. **39**(1-2): p. 33-42.

68. Schieweck, O., Damme, M., Schroder, B., Hasilik, A., Schmidt, B., and Lubke, T., *NCU-G1 is a highly glycosylated integral membrane protein of the lysosome*. Biochem J, 2009. **422**(1): p. 83-90.
69. Savkur, R.S. and Burris, T.P., *The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif*. The Journal of Peptide Research, 2004. **63**(3): p. 207-212.
70. Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D.L., Valenza, M., Gennarino, V.A., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R.S., Banfi, S., Parenti, G., Cattaneo, E., and Ballabio, A., *A gene network regulating lysosomal biogenesis and function*. Science, 2009. **325**(5939): p. 473-7.
71. Kong, Y.X., Kåsi, C., Andersson, B.K., Duale, N., Mæhlen, J., Løberg, E., Lorenzo, I.P., Kase, E.T., Thoresen, G.H., Rustan, A.C., and Eskild, W., *Characterization of the NCU-G1 knockout mouse - a potentially new model for liver fibrosis*, 2012: Unpublished work.
72. Peters, L.L., Robledo, R.F., Bult, C.J., Churchill, G.A., Paigen, B.J., and Svenson, K.L., *The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(1): p. 58-69.
73. Garcia-Otin, A.L. and Guillo, F., *Mammalian genome targeting using site-specific recombinases*. Front Biosci, 2006. **11**: p. 1108-36.
74. Kong, X.Y., *Personlig kommentar*, 2012.
75. Hansen, E.E.H., *Personlig kommentar*, 2011.
76. Brown, P.J., Stuart, L.W., Hurley, K.P., Lewis, M.C., Winegar, D.A., Wilson, J.G., Wilkison, W.O., Ittoop, O.R., and Willson, T.M., *Identification of a subtype selective human PPARalpha agonist through parallel-array synthesis*. Bioorg Med Chem Lett, 2001. **11**(9): p. 1225-7.
77. Oliver, W.R., Jr., Shenk, J.L., Snaith, M.R., Russell, C.S., Plunket, K.D., Bodkin, N.L., Lewis, M.C., Winegar, D.A., Sznaidman, M.L., Lambert, M.H., Xu, H.E., Sternbach, D.D., Kliewer, S.A., Hansen, B.C., and Willson, T.M., *A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(9): p. 5306-11.
78. Terada, H., *Uncouplers of oxidative phosphorylation*. Environ Health Perspect, 1990. **87**: p. 213-8.
79. Aas, V., Hessvik, N.P., Wettergreen, M., Hvammen, A.W., Hallen, S., Thoresen, G.H., and Rustan, A.C., *Chronic hyperglycemia reduces substrate oxidation and impairs metabolic switching of human myotubes*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1812**(1): p. 94-105.
80. Hessvik, N.P., Boekschoten, M.V., Baltzersen, M.A., Kersten, S., Xu, X., Andersen, H., Rustan, A.C., and Thoresen, G.H., *LXR{beta} is the dominant LXR subtype in skeletal muscle regulating lipogenesis and cholesterol efflux*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298**(3): p. E602-13.
81. Science, R.A. *Tissue Dissociation - Liberase Purified Collagenase Blends for Tissue Dissociation*. 2012 08.12.2012]; Available from: https://www.roche-applied-science.com/sis/collagenase/index.jsp?id=col_000000.
82. Springer, M.L., Rando, T.A., and Blau, H.M., *Gene delivery to muscle*. Curr Protoc Hum Genet, 2002. **Chapter 13**: p. Unit 13 4.
83. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P., *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed2002, New York: Garland Science.
84. Wensaas, A.J., Rustan, A.C., Lovstedt, K., Kull, B., Wikstrom, S., Drevon, C.A., and Hallen, S., *Cell-based multiwell assays for the detection of substrate accumulation and oxidation*. J Lipid Res, 2007. **48**(4): p. 961-7.

85. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
86. Arya, M., Shergill, I.S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., and Patel, H.R., *Basic principles of real-time quantitative PCR*. Expert Rev Mol Diagn, 2005. **5**(2): p. 209-19.
87. Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A., and Zoric, N., *The real-time polymerase chain reaction*. Mol Aspects Med, 2006. **27**(2-3): p. 95-125.
88. Lutfalla, G. and Uze, G., *Performing quantitative reverse-transcribed polymerase chain reaction experiments*. Methods Enzymol, 2006. **410**: p. 386-400.
89. Reece, R.J., *Analysis of Genes and Genomes*2004, England: John Wiley and Sons Ltd.
90. Carr, S.M. *The Polymerase Chain reaction (PCR)*. 2010 20.02.2012]; Available from: http://www.mun.ca/biology/scarr/PCR_simplified.html.
91. Schefe, J.H., Lehmann, K.E., Buschmann, I.R., Unger, T., and Funke-Kaiser, H., *Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula*. J Mol Med (Berl), 2006. **84**(11): p. 901-10.
92. invitrogen, *Real-time PCR: from theory to practice*. 2008.
93. Rieu, I. and Powers, S.J., *Real-time quantitative RT-PCR: design, calculations, and statistics*. Plant Cell, 2009. **21**(4): p. 1031-3.
94. Gallagher, S.R. and Desjardins, P.R., *Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy*. Curr Protoc Mol Biol, 2006. **Appendix 3**: p. Appendix 3D.
95. Gallagher, S., Winston, S.E., Fuller, S.A., and Hurrell, J.G., *Immunoblotting and immunodetection*. Curr Protoc Mol Biol, 2008. **Chapter 10**: p. Unit 10 8.
96. GE Healthcare Bio-Sciences, A., *Western Blotting Principles and Methods*2011.
97. Station, M. *Western Blot*. 2005-2011 13.03.2012]; Available from: <http://www.molecularstation.com/protein/western-blot/>.
98. Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L., *Biochemistry*. 5th edition ed2002, New York, USA: W.H. Freeman.
99. Puigserver, P., *Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1-alpha*. Int J Obes (Lond), 2005. **29 Suppl 1**: p. S5-9.
100. Mandard, S., Zandbergen, F., Tan, N.S., Escher, P., Patsouris, D., Koenig, W., Kleemann, R., Bakker, A., Veenman, F., Wahli, W., Muller, M., and Kersten, S., *The direct peroxisome proliferator-activated receptor target fasting-induced adipose factor (FIAF/PGAR/ANGPTL4) is present in blood plasma as a truncated protein that is increased by fenofibrate treatment*. J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34411-20.
101. Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F., and Rudnicki, M.A., *Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle*. Cell, 2007. **129**(5): p. 999-1010.
102. Evans, M.J., Carlton, M.B., and Russ, A.P., *Gene trapping and functional genomics*. Trends Genet, 1997. **13**(9): p. 370-4.
103. Bonavaud, S., Agbulut, O., Nizard, R., D'Honneur, G., Mouly, V., and Butler-Browne, G., *A discrepancy resolved: human satellite cells are not preprogrammed to fast and slow lineages*. Neuromuscul Disord, 2001. **11**(8): p. 747-52.
104. Guo, Y., Xiao, P., Lei, S., Deng, F., Xiao, G.G., Liu, Y., Chen, X., Li, L., Wu, S., Chen, Y., Jiang, H., Tan, L., Xie, J., Zhu, X., Liang, S., and Deng, H., *How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2008. **40**(5): p. 426-36.

105. Bonen, A., Dyck, D.J., Ibrahimi, A., and Abumrad, N.A., *Muscle contractile activity increases fatty acid metabolism and transport and FAT/CD36*. Am J Physiol, 1999. **276**(4 Pt 1): p. E642-9.
106. Bonen, A., Luiken, J.J., Liu, S., Dyck, D.J., Kiens, B., Kristiansen, S., Turcotte, L.P., Van Der Vusse, G.J., and Glatz, J.F., *Palmitate transport and fatty acid transporters in red and white muscles*. Am J Physiol, 1998. **275**(3 Pt 1): p. E471-8.
107. Qi, C., Zhu, Y., Pan, J., Yeldandi, A.V., Rao, M.S., Maeda, N., Subbarao, V., Pulikuri, S., Hashimoto, T., and Reddy, J.K., *Mouse steroid receptor coactivator-1 is not essential for peroxisome proliferator-activated receptor alpha-regulated gene expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(4): p. 1585-90.
108. Rang, H.P., *The receptor concept: pharmacology's big idea*. Br J Pharmacol, 2006. **147 Suppl 1**: p. S9-16.
109. Fritah, A., Christian, M., and Parker, M.G., *The metabolic coregulator RIP140: an update*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **299**(3): p. E335-40.
110. Herzog, B., Hallberg, M., Seth, A., Woods, A., White, R., and Parker, M.G., *The nuclear receptor cofactor, receptor-interacting protein 140, is required for the regulation of hepatic lipid and glucose metabolism by liver X receptor*. Mol Endocrinol, 2007. **21**(11): p. 2687-97.

Appendiks

1. Donorkarakteristika

1.1: Donorkarakteristika for myotuber fra mus

Oversikt over donorene arbeidet med i denne masteroppgaven, og fordelingen med hensyn på kjønn og alder ved avlivning.

Donor	ID	Kjønn	Alder ved avlivning (dager)
Villtype-mus	VT F1	Hunn	145
	VT M5	Hann	98
	VT F3	Hunn	64
Knockout-mus	KO F2	Hunn	171
	KO M7	Hann	98
	KO M8	Hann	98
	KO M10	Hann	98

1.2. Donorkarakteristikk for humane myotuber

Oversikt over de humane donorene benyttet i denne masteroppgaven, og fordelingen med hensyn på alder, kjønn og BMI. Donorene er inndelt i tre grupper; normalvektige (LD), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige med type 2-diabetes (EO-T2D).

Donortype	ID	Alder (år)	Kjønn	KMI
LD	LD 11	28	Mann	Ukjent
	LD 23	61	Kvinne	21,8
	LD 32	34	Kvinne	22,3
EO-NGT	EO-NGT 7	39	Kvinne	51
	EO-NGT 52	50	Kvinne	50
	EO-NGT 58	40	Kvinne	40
EO-T2D	EO-T2D 3	63	Mann	44
	EO-T2D 45	58	Mann	45
	EO-T2D 53	54	Mann	37
	EO-T2D 56	44	Kvinne	41

2. Medier til celledyrking

2.1. Proliferasjonsmedium

400 ml Hams F-10 Glutamax nutrient mixture
100 ml Føtalt storfeserum (FBS)
2,5 ml Penicillin/Streptomycin 10 000 enheter/ml
2,5 ml Fungizone
5 ng/ml basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)

2.2. Vekstmedium

200 ml Dulbecco`s Modified Eagle medium med Glutamax (DMEM) (1g/L glukose)
200 ml Hams F-10 Glutamax nutrient mixture
100 ml Føtalt storfeserum (FBS)
2,5 ml Penicillin/Streptomycin 10 000 enheter/ml
2,5 ml Fungizone
5 ng/ml basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)

2.3. Frysemedium

Til 1 ml frysemedium:

650 µl Vekstmedium
100 µl Dimetylsulfoksid (DMSO)
250 µl Føtalt storfeserum (FBS)

2.4. Differensieringsmedium

500 ml Dulbecco`s Modified Eagle medium med Glutamax (DMEM) (1g/L glukose)
10 ml Hesteserum
2,5 ml Penicillin/Streptomycin 10 000 enheter/ml
2,5 ml Fungizone

3. Coating av celleflasker til celledyrking

3.1. Prosedyre for coating av celleflasker med Kollagen I

Kollagen I ble fortynnet til en 0,01 % løsning i kaldt, autoklavert dH₂O. Uttak på 1 og 2 ml av denne løsningen ble overført til henholdsvis 25 cm² og 75 cm² celleflasker uten coating fra NUNC. Coatingen ble fordelt over hele bunnen til celleflaskene, før de ble satt i kjøleskap over natt. Neste dag ble overflødig coating fjernet og celleflaskene satt til tørking uten kork i noen timer.

4. Øvrige medier

4.1. DPBS m/HEPES:

500 ml Dulbecco's Phosphate Buffered Salin (DPBS)

1,19 g HEPES

pH justeres til 7,2 med 1 M svovelsyre (H₂SO₄)

4.2. 1x Høstebuffer:

8 g NaCl

0,2 g KH₂PO₄

2,9 g Na₂HPO₂·2H₂O

0,2 g KCl

Ad 1 liter dH₂O

pH justeres til 7,2-7,4 med 1 M svovelsyre (H₂SO₄)

5. Akuttmedier til substratoksidasjonsmetoden

5.1. [1-¹⁴C]oljesyre (OA) med total oljesyrekonsentrasjon på 100 µM

80 brønner:

Reagens	Volum	Konsentrasjon
Umerket OA	72,8 µl	91 µM
[1- ¹⁴ C]OA	24 µl	9 µM
BSA	14,4 µl	7,2 µM
Karnitin	4,8 µl	1 µM
DPBS m/HEPES	Ad 4,8 ml	-

5.2. [1-¹⁴C]oljesyre (OA) med total oljesyrekonsentrasjon på 600 µM

80 brønner:

Reagens	Volum	Konsentrasjon
Umerket OA	472,8 µl	591 µM
[1- ¹⁴ C]OA	24 µl	9 µM
BSA	14,4 µl	7,2 µM
Karnitin	4,8 µl	1 µM
DPBS m/HEPES	Ad 4,8 ml	-

5.3. [1-¹⁴C]oljesyre (OA) med total oljesyrekonsentrasjon på 100 µM

20 brønner:

Reagens	Volum	Konsentrasjon
Umerket OA	15,2 µl	91 µM
[1- ¹⁴ C]OA	5 µl	9 µM
BSA	3 µl	7,2 µM
Karnitin	1 µl	1 µM
DPBS m/HEPES	Ad 1 ml	-
± FCCP *	0,4 µl	1 µM

* FCCP tilsettes i 8 av 20 brønner

5.4. D-[¹⁴C(U)]glukose med total glukosekonsentrasjon på 200 µM

20 brønner:

Reagens	Volum	Konsentrasjon
D-[¹⁴ C(U)]glukose	0,6 µl	200 µM
BSA	3 µl	7,2 µM
Karnitin	1 µl	1 µM
DPBS m/HEPES	Ad 1 ml	-

5.5. D-[¹⁴C(U)]glukose med total glukosekonsentrasjon på 200 µM

20 brønner:

Reagens	Volum	Konsentrasjon
D-[¹⁴ C(U)]glukose	0,6 µl	200 µM
BSA	3 µl	7,2 µM
Karnitin	1 µl	1 µM
DPBS m/HEPES	Ad 1 ml	-
± FCCP *	0,4 µl	1 µM

* FCCP tilsettes i 8 av 20 brønner

5.6. [1-¹⁴C]oljesyre (OA) med total oljesyrekonsentrasjon på 100 µM + 200 µM umerket glukose

20 brønner:

Reagens	Volum	Konsentrasjon
Umerket OA	15,2 µl	91 µM
[1- ¹⁴ C]OA	5 µl	9 µM
Umerket Glukose	0,2 µl	200 µM
BSA	3 µl	7,2 µM
Karnitin	1 µl	1 µM
DPBS m/HEPES	Ad 1 ml	-
± FCCP *	0,4 µl	1 µM

* FCCP tilsettes i 8 av 20 brønner

5.7. D-[¹⁴C(U)]glukose med total glukosekonsentrasjon på 200 µM + 100 µM umerket oljesyre

20 brønner:

Reagens	Volum	Konsentrasjon
D-[¹⁴ C(U)]glukose	0,6 µl	200 µM
OA	16,7 µl	100 µM
BSA	3 µl	7,2 µM
Karnitin	1 µl	1 µM
DPBS m/HEPES	Ad 1 ml	-
± FCCP *	0,4 µl	1 µM

* FCCP tilsettes i 8 av 20 brønner

6. Syntese av cDNA, verifisering av primerkvalitet og kvantifisering ved hjelp av real-time RT-PCR

6.1. Templat-Primer-miks til syntese av cDNA

Reagens	Volum per prøve	Endelig konsentrasjon
Totalt RNA	x µl *	-
Random Hexamer Primer (600 pmol/µl)	2 µl	60 µM
Vann PCR-grad	Ad 13 µl	-
Totalt volum	13 µl	-

* Volum beregnes ut ifra prøvens RNA-konsentrasjon, og tilsettes til en total mengde på 5 µg

6.2. Mastermiks for syntese av cDNA

Reagens	Volum per prøve	Endelig konsentrasjon
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer (5x)	4 µl	1 x
Protector RNase inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl	-
Deoxynucleotide Mix (10 mM av hver)	2 µl	1 mM av hver
Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/µl)	0,5 µl	-
Total volum	7 µl	-

6.3. Primerspesifikk mastermiks til verifisering av primerkvalitet

Reagens	Volum per prøve
Primer Forward (10 x)	0,5 µl
Primer Reverse (10 x)	0,5 µl
Master miks (2 x)	3 µl
Vann PCR-grad	5 µl
<i>Total volum</i>	<i>9 µl</i>

6.4. 50 x Tris-acetat-etyldiamintetraeddiksyre (TAE)-buffer

242 g Tris base

57,1 ml iseddik

37,2 g Na₂EDTA*2H₂O

Ad 1 liter dH₂O

Fortynnes til 1 x med dH₂O

6.5. Primerspesifikk mastermiks til kvantifisering ved hjelp av real-time RT-PCR

Reagens	Volum per prøve
Primer Forward (10 x)	0,5 µl
Primer Reverse (10 x)	0,5 µl
Master miks (2 x)	3 µl
Vann, PCR-grad	5 µl
<i>Total volum</i>	<i>9 µl</i>

7. Westernblotting

7.1. 2 x Sample buffer:

12.5 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6.8)

10 ml glyserol

20 ml 10 % SDS

Ad 50 ml dH₂O

7.2. 1x Tris-bufret saltløsning med 0,1 % Tween (TBST):

20 mM Tris-HCl (pH 7,5)

500 mM NaCl

0,1 % Tween

Ad 1 l dH₂O

7.3. Bløkkebuffer:

0,5 g Skim Milk powder

Ad 10 ml TBST

8. Formler til relativ kvantifisering ved real-time RT-PCR

Terskelverdien konverteres til en relativ andel av mengden utgangstemplat:

Den relative mengden fragmenter ved deteksjonsgrensen settes lik 1;

$$A1) \quad RQ = \frac{1}{E^{CT}}$$

RQ; relativ andel, E; primereffektiviteten, CT; terskelverdi

RQ-verdien til målgenet normaliserer mot RQ-verdien til husholdningsgenet:

$$A2) \quad NRQ (\text{målgen}) = \frac{RQ (\text{målgen})}{RQ (HG)}$$

NRQ; normalisert relativ andel, HG; husholdningsgen

Ratioen til gjennomsnittet til de normaliserte RQ-verdiene, til test og kontroll:

$$A3) \quad Ratio = \frac{Gjennomsnitt \ NRQ \ (test)}{Gjennomsnitt \ NRQ \ (kontroll)}$$

Test; behandling, EO-donor eller knockout, kontroll; ubehandlet, LD-donor eller villtype

Standardfeilen til ratioene:

$$A4) \quad Se \left(\frac{\overline{NRQ}_{Test}}{\overline{NRQ}_{Kontroll}} \right) = \left[\frac{\overline{NRQ}_{Test}^2}{\overline{NRQ}_{Kontroll}^2} \left\{ \frac{Se(\overline{NRQ}_{Test})^2}{\overline{NRQ}_{Test}^2} + \frac{Se(\overline{NRQ}_{Kontroll})^2}{\overline{NRQ}_{Kontroll}^2} \right\} \right]^{\frac{1}{2}}$$

\overline{NRQ}_{Test} , $\overline{NRQ}_{Kontroll}$; gjennomsnittet av NRQ til test og kontroll

$Se(\overline{NRQ}_{Test})$, $Se(\overline{NRQ}_{Kontroll})$; standardfeilene til test og kontroll

